

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İSKELET KASI DEJENERASYONU SÜRECİNDE STROMAL HÜCRE ALT  
GRUPLARININ İNCELENMESİ**

**Cansu ÖZDEMİR SAKA**

**Kök Hücre Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2017**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İSKELET KASI DEJENERASYONU SÜRECİNDE STROMAL HÜCRE ALT  
GRUPLARININ İNCELENMESİ**

**Cansu ÖZDEMİR SAKA**

**Kök Hücre Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Çetin KOCAEFE**

**ANKARA  
2017**

**İSKELET KASI DEJENERASYONU SÜRECİNDE STROMAL HÜCRE ALT GRUPLARININ  
İNCELENMESİ**

**Cansu ÖZDEMİR SAKA**

Bu çalışma 25/12/2017 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Programı"  
nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:**

*Prof. Dr. Şükriye AYTER*

*TOBB ETÜ Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü*

**Tez Danışmanı:**

*Prof. Dr. Çetin KOCAEFE  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji A.D*

**Üye:**

*Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA  
Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Kök Hücre Bilimleri A.D*

**Üye:**

*Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI  
Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü  
Temel Onkoloji A.D*

**Üye:**

*Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY  
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü  
Biyoteknoloji A.D*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

**26 Aralık 2017**

**Prof. Dr. Diclehan Orhan**

**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini

Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir. (Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

o Tezimin/Raporumun **01 Ocak 2021** tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum. (Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

27.12.2017

Cansu ÖZDEMİR SAKA

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof.Dr. Çetin KOCAEFE danışmanlığında, tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

**Cansu ÖZDEMİR SAKA**



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her türlü bilimsel bilgi ve donanımı bana kazandıran danışmanım sayın Prof.Dr. Çetin KOCAEFE'ye,

Doktora eğitimim boyunca, eğitim ve tez sürecim ile ilgili her türlü desteği sağlayan sayın Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA'ya,

Akım sitometri çalışmalarının gerçekleştirilmesinde sağladığı bilimsel ve teknik katkılarından dolayı sayın Doç.Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya ve Uzm. Bio. Diğdem YÖYEN ERMIŞ'e,

Yüksek ölçekli RNA dizileme çalışmalarının gerçekleştirilmesinde sağladığı bilimsel ve teknik katkılarından dolayı sayın Yrd. Doç.Dr. Ekim TAŞKIRAN'a ve Uzm. Bio. Beren KARAOSMANOĞLU'na

Hayvan deneylerindeki teknik yardımlarından dolayı, Uzm. Bio. Duygu Akçay'a ve Hasan KILIÇ'a,

Eğitim sürecim boyunca beni bu konuda destekleyen ve her türlü fedakarlığı gösteren başta sevgili eşim Mehmet SAKA' ya ve aileme,

En içten duygularla teşekkür ederim.

Bu tez kapsamında yapılan tüm çalışmalar TÜBİTAK'ın SBAG 115S849 numaralı projesinden karşılanmıştır.

## ÖZET

**Saka Özdemir C. İskelet Kası Dejenerasyonu Sürecinde Stromal Hücre Alt Gruplarının İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017.** İskelet kası dejenerasyon patolojisinin karakteristik bulguları kas lifi atrofisi ve fibrozis gelişimidir. Kas hastalıklarının tedavisine yönelik geliştirilen genetik ve hücresel tedavi yaklaşımları fibrozis nedeniyle yetersiz kalmıştır. Fibrozisin hücresel gelişim mekanizmalarının yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda, “Fibro/Adipojenik projenitörler (FAP)” (CD45(-), CD31(-), CD11b(-), Sca1(+), CD140a(+)) olarak isimlendirilen stromal hücre popülasyonunun, dokuda fibrozis gelişimini sağlayan ana hücre grubu olduğu ve aktivasyonunun inflamasyon ile ilişkili olduğu tanımlanmıştır. Ancak FAP hücrelerinin inflamasyondan bağımsız dejenerasyon patolojilerinde fibrozis gelişim mekanizmasına olan etkisi bilinmemektedir. Bu tez çalışması kapsamında, gerçekleştirilen akut kas hasarı, tenotomi ve denervasyon modellerinde stromal hücre değişim profillemesi CD140a(+)/Sca1(-), CD140a(+)/Sca1(+), CD140a(-)/Sca1(+) yüzey belirteçleri yönünden gerçekleştirilmiş olup, hücresel aktivasyonların inflamasyon ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Tez çalışması sonucunda inflamatuvar ve endotel hücre grubunun dışında kalan hücre popülasyonu içinde, akut kas hasarında CD140a(+)/Sca1(+) hücre grubu dramatik bir artış göstermiş olup, Sca1(+)/CD140a(-) hücre popülasyonunda sınırlı bir hücresel aktivasyon meydana gelmiştir. Tenotomi modelinde sadece CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonu, denervasyon modelinde ise CD140a(+)/Sca1(+) hücre popülasyonu aktive olmuştur. CD140a(+)/Sca1(-) hücre popülasyonunda her üç modelde herhangi bir oransal değişim meydana gelmemiştir. Tez çalışması sonucunda, kronik dejenerasyon modellerinde meydana gelen stromal hücre aktivasyonunun inflamasyondan bağımsız olarak meydana geldiği, tenotomi ve akut hasar modellerinde aktivasyon gösteren CD140a(-)/Sca1(+) hücre topluluğunun, CD140a(+)/Sca1(+) hücre popülasyonundan farklı bir stromal hücre grubu olduğu ve yüksek ölçekli RNA dizileme analizi sonucunda, fibrozis gelişimini sağladığı gösterilmiştir

Anahtar kelimeler : İskelet kası dejenerasyonu, Fibrozis, Fibroadipojenik projenitör



**ABSTRACT**

**Saka Özdemir C. Investigation of Stromal Cell Subgroups on the Course of Skeletal Muscle Degeneration. Hacettepe University Institute of Health Sciences, PhD Thesis in Stem Cell, Ankara 2017.** The characteristics of the skeletal muscle degeneration are muscle fiber atrophy and fibrosis. The genetic and cellular therapeutic approaches for skeletal muscle treatment remain incapable due to the fibrosis. Studies concerning the cellular development of fibrosis demonstrated that “Fibro/Adipogenic progenitors (FAP)” ((CD45(-), CD31(-), CD11b(-), Sca1(+), CD140a(+)), are the primary stromal cell population that causes fibrosis and their activation is related to inflammation. However, the effect of FAP cells on the fibrosis development in chronic muscle degeneration is still unknown in the absence of inflammation. In this thesis, changes of stromal cell populations including CD140a(+)/Sca1(-), CD140a(+)/Sca1(+), and CD140a(-)/Sca1(+) was examined in experimental acute muscle injury, tenotomy, and denervation models. In addition, the correlation between cell activation and inflammation was investigated. Our results showed that CD140a(+)/Sca1(+) cells drastically increased and Sca1(+)/CD140a(-) cell population was limited cellular activation in the presence of acute muscle injury. Only CD140a(-)/Sca1(+) cell population was activated in tenotomy while CD140a(+)/Sca1(+) cells was activated in denervation. In all three experimental models, there were no significant quantitative differences in terms of CD140a(+)/Sca1(-) cell population. This thesis study proved that the activation of stromal cells in chronic degeneration model occurs inflammation-independent and the CD140a(-)/Sca1(+) cell population which is active in tenotomy and acute muscle injury is different from CD140a(+)/Sca1(+) stromal cell population. In addition, these cells have been shown to contribute fibrosis development as a result of RNA sequencing analysis.

Keywords: Skeletal muscle degeneration, Fibrosis, Fibroadipogenic progenitor

**İÇİNDEKİLER**

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. İskelet Kas Dokusunun Genel Özellikleri	3
2.2. İskelet Kas Dokusunun İdamesi ve Rejenerasyonu	4
2.2.1. Akut Kas Hasarı ve Rejenerasyon Sürecinde İnflamatuar Hücrelerin Etkisi	5
2.2.2. Kronik Kas Dejenerasyonu ve İnflamatuar Hücrelerin Etkisi	7
2.3. Kas Dokusunun Hücresel Bileşenleri	8
2.3.1. Miyojenik Farklılaşma Özelliği Bulunan Kök/Projenitör Hücreler	8
2.3.2. Miyojenik Farklılaşma Özelliği Bulunmayan Kök/Projenitör Hücreler	10
2.4. Fibrozisin Hücresel ve Moleküler Gelişim Mekanizması	15
2.5. İskelet Kası Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri	17
2.5.1. Genetik Modeller	17
2.5.2. Akut Hasar Modeli	18
2.5.3. Hareketsizleştirme Modelleri	18

<b>3.</b>	<b>GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>20</b>
<b>3.1.</b>	<b>GEREÇ</b>	<b>20</b>
3.1.1.	Cerrahi Malzemeler	20
3.1.2.	Akut Kas Hasar Modeli	20
3.1.3.	Akut ve Kronik Hasar Sürecinde Hücre Aktivasyon Analizi	20
3.1.4.	Doku Bloklama	20
3.1.5.	Histolojik Analiz	20
3.1.6.	İmmunfloresan Boyama	20
3.1.7.	Tek Çekirdekli Hücre İzolasyonu	21
3.1.8.	Yüzey Belirteç Boyaması	21
3.1.9.	BrdU Boyaması	21
3.1.10.	Stromal Hücre Kültürü	22
3.1.11.	Adipojenik Farklılaşma Ortamı	22
3.1.12.	Miyojenik Farklılaşma Ortamı	22
3.1.13.	RNA İzolasyonu	22
3.1.14.	cDNA Kütüphanesi Oluşturma	23
3.1.15.	Yüksek Ölçekli RNA Dizileme	23
<b>3.2.</b>	<b>YÖNTEMLER</b>	<b>24</b>
3.2.1.	Akut Kas Dejenerasyon Modelinin Oluşturulması	24
3.2.2.	Kronik Kas Dejenerasyon Modelinin Oluşturulması	24
3.2.2.1.	Tenotomi Modelinin Oluşturulması	25
3.2.2.2.	Denervasyon Modelinin Oluşturulması	25
3.2.3.	Dokudan Mononükleer Hücre İzolasyonu	26
3.2.4.	Hücre Yüzey Belirteç İşaretleme	27
3.2.5.	Akut ve Kronik Hasar Sürecinde Aktive Olan Hücre Populasyonlarının Saptanması Amacı ile BrDU boyaması	28
3.2.6.	Stromal Hücre Kültürü	29
3.2.7.	Adipojenik Farklılaşma Ortamı	29
3.2.8.	Miyojenik Farklılaşma Ortamı	30
3.2.9.	RNA İzolasyonu	30

3.2.10.	İmmunfloresan Boyama	31
3.2.11.	Yüksek Ölçekli RNA Dizileme Çalışması	32
3.2.12.	Verilerin Değerlendirilmesi ve Analizi	36
4	BULGULAR	37
4.1	Akut Kas Dejenerasyonunun Oluşturulması ve Hasar Sonrası Tamir Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi.	37
4.1.1.	Akut Kas Dejenerasyon Modelinin Oluşturulması	37
4.1.2.	Hasar Sonrası Tamir Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi	38
4.2.	Tenotomi Modelinin Oluşturulması ve Dejenerasyon Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi	42
4.2.1.	Tenotomi Modelinin Oluşturulması	42
4.2.2.	Tenotomi Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi	44
4.2.3.	Tenotomi sürecinde inflamatuvar hücre populasyon değişiminin incelenmesi.	48
4.3	Denervasyon Modelinin Oluşturulması ve Dejenerasyon Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi	50
4.3.1	Denervasyon Modelinin Oluşturulması	50
4.3.2	Dejenerasyon Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi	51
4.3.3	Denervasyon sürecinde inflamatuvar hücre populasyon değişiminin incelenmesi	55
4.4	Stromal Hücre İzolasyonu, Kültürü ve Karakterizasyonu	56
4.4.1	Stromal Hücre İzolasyonu	56
4.4.2	Stromal Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu	57
4.4.3	Dejenerasyon Sürecinde Aktive Olan CD140a(-)/Sca1(+) Hücre Populasyonunun Yüksek Ölçekli RNA Dizileme Analizi ile İncelenmesi	59
4.4.4	Tenotomi Sürecinde Total Kas Dokusunda Değişim Gösteren Gen İfade Değişimiyle Dejenerasyon Sürecinde Aktive Olan CD140a(-) /Sca1(+) Hücre Populasyonunun Yüksek Ölçekli RNA Dizileme Analizinin Karşılaştırılması	66
5	TARTIŞMA	68

5.1	Akut Hasar Sürecinde İnflamasyon ile İlişkili Değişen Stromal Hücre Populasyonu	70
5.2	Tenotomi Sürecinde Değişen Stromal Hücre Populasyonu ve İnflamasyon İlişkisi	72
5.3	Denervasyon Sürecinde Değişen Stromal Hücre Populasyonu ve İnflamasyon İlişkisi.	73
5.4	CD140a(-)Sca1(+) Hücre Populasyonunun İzolasyonu ve Karakterizasyonu	75
5.5	CD140a(-)Sca1(+) Hücre Populasyonunun Aktivasyon Mekanizmasının İncelenmesi	76
6	SONUÇ ve ÖNERİLER	78
6.1	Sonuçlar	78
6.2	Öneriler	79
7	KAYNAKLAR	80
8	EKLER	84
	EK-1: Yüksek Ölçekli RNA Dizi Analizi Kalite Kontrol Parametreleri	
	EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
9	ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALS	<i>Amyotrophic lateral sclerosis</i>
BrdU	Bromodeoxyuridine
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
DMD	<i>DuchenneMuscularDystrophy</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
dsDNA	<i>Double stranded DNA</i>
ECM	<i>Extra Cellular Matrix</i>
FAP	<i>Fibro Adipogenic Precursor</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GRMD	<i>Golden Retriever Muscular Dystrophy</i>
IGF-I	<i>Insulin-like Growth FactorI</i>
IL-4	<i>Interleukin 4</i>
IL-10	<i>Interleukin 10</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
LAP	<i>Latency Associated Factor</i>
MMP2	<i>Matrix Metalloproteinase 2</i>
MMP9	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NO	<i>Nitrik Oksit</i>
PRZ	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol3-Kinase</i>
POSTN	<i>Periostin</i>
SMA	<i>Spinal Muscular Atrophy</i>
TNF-a	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>

TGF- $\beta$       *Transforming Growth Factor- $\beta$*

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>	
2.1.	İskelet kas dokusunun genel yapısı.	3
2.2.	Akut hasar sonrası tamir sürecine inflamatuvar hücrelerin rolleri	6
2.3.	Satellit hücre aktivasyonu ve kas tamiri	9
2.4.	Akut hasar ve kronik dejenerasyonda FAP regülasyon şeması.	14
2.5.	A Sağlıklı kas dokusu. B Duchenne Kas Distrofisi kas dokusu	15
4.1.	Akut hasar sonrası tamir sürecinin 3. ve 6. günleri.	37
4.2.	Akut hasar sonrası 3. gün stromal hücre değişim profili.	38
4.3.	CD45(-), CD11b(-), CD31(-) populasyon içinde akut hasar sonrası 3. gün stromal hücre değişim profili.	39
4.4.	CD45(-), CD11b(-), CD31(-) populasyon içinde akut hasar sonrası 3. gün kontrole göre stromal hücre kat değişimleri	39
4.5.	Tüm populasyon içinde akut hasar sonrası 3. gün stromal hücre değişim profili	40
4.6.	Tüm populasyon içinde akut hasar sonrası 3. gün kontrole göre stromal hücre kat değişimleri	40
4.7.	Akut hasar sürecinde stromal hücre aktivasyon oranı.	41
4.8.	Anterior tibial tendon	42
4.9.	Tendon kesisi sonrası ayak postur değişimi.	43
4.10.	İşlem sonrası 7. gün ayak postur değişimi devamlılığı.	43
4.11.	Tenotomi sonrası zamana bağlı kas dejenerasyonunun H&E boyaması ile gözlemlenmesi	43
4.12.	CD45(-), CD11b(-), CD31(-) populasyon içinde tenotomi sonrası 3. ve 7.günler stromal hücre değişim profili	44
4.13.	CD45(-), CD11b(-), CD31(-) populasyon içinde tenotomi sonrası 3. ve 7.günler stromal hücre kat değişimi	45
4.14.	Tüm hücre populasyonu içinde tenotomi sonrası 3. ve 7.günler stromal hücre değişim profili	45
4.15.	Tüm hücre populasyonu içinde tenotomi sonrası 3. ve 7.günler stromal hücre kat değişimi.	46
4.16.	Tenotomi sürecinde stromal hücre aktivasyon oranı	47



4.17.	Tenotomi sürecinde aktive olan stromal hücreler	48
4.18.	Tenotomi sürecinde inflamatuvar hücre değişimi	49
4.19.	Sağ bacak siyatik siniri	50
4.20.	Sağ bacak siyatik sinir kesisi.	50
4.21.	Denervasyon sonrası 10. gün sağ bacak postur bozukluğu	51
4.22.	Denervasyon sonrası 10. gün gastrocnemius kası H&E boyaması.	51
4.23.	CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) populasyon içinde denervasyon sonrası 10. gün stromal hücre değişim profili	52
4.24.	CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) populasyon içinde denervasyon sonrası 10. gün stromal hücre kat değişimi	52
4.25.	Tüm populasyon içinde denervasyon sonrası 10. gün stromal hücre değişim profili.	53
4.26.	Tüm populasyon içinde denervasyon sonrası 10. gün stromal hücre kat değişimi.	53
4.27.	Denervasyon sonrası 10. gün stromal hücre aktivasyonu	54
4.28.	Denervasyon sürecinde inflamatuvar hücre değişimi	55
4.29.	CD140a(-)/Sca1(+) hücre populasyonunun izolasyon öncesi ve sonrası oranları	56
4.30.	CD140a(-)/Sca1(+)stromal hücre kültürü	57
4.31.	Miyojenik ve Adipojenik farklılaşma 3. gün ve 10. günler	58
4.32.	İfade artışı gösteren genlerde yolak analizi. ECM-reseptör etkileşimi	61
4.33.	İfade artışı gösteren genlerde yolak analizi. PI3K-Akt Sinyal Yolağı	62
4.34.	İfade artışı gösteren genlerde yolak analizi. TGF-Beta Sinyal Yolağı	62
4.35.	İfade azalışı gösteren genlerde yolak analizi. Hücre adezyon molekülleri	65
4.36.	Tenotomize kas dokusu ve CD140a(-)/Sca1(+) hücrelerin gen listelerinin karşılaştırılması	66
4.37.	Tenotomi kas dokusu ve tenotomi sürecinde aktive olan CD140a(-)/Sca1(+) hücrelerin ifade artışı gösterdiği ortak genler için yolak analizi	66
4.38.	Tenotomi sürecinde ve CD140a(-)/Sca1(+) hücre aktivasyonunda ifade artışı gösteren genlerin protein-protein etkileşim diyagramı	67

**TABLULAR DİZİNİ**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
3.1.	Stromal hücre kültür ortamı	29
3.2.	Adipojenik farklılaşma besi ortamı	29
3.3.	Miyojenik farklılaşma besi ortamı	30
4.1.	DAVID Annotation Tool Cluster Analizi	60
4.2.	Aktive olmuş CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunda artış gösteren ve fibrozis ile ilişkili genler	63
4.3.	Aktive olmuş CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunda artış gösteren, ECM yeniden modellenmesi ve fibrozis ile ilişkili genler	64
4.4.	Aktive olmuş CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunda artış gösteren diğer faktörler	65

## 1. GİRİŞ

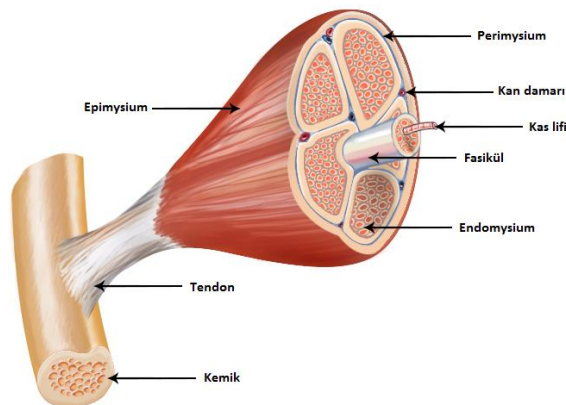
İskelet kas dokusu dejenerasyonu kas lifi atrofisi ve fibrozis gelişimi ile meydana gelen patolojik bir durumdur. Bu patoloji doku işlevinde önemli role sahip yapısal proteinlerin eksikliğine bağlı meydana geldiği gibi senil işlev kaybına bağlı olarakta meydana gelmektedir. Kas dejenerasyonu patolojik bulguları farklı oluşum mekanizmalarına sahip olmasına rağmen dokuda meydana gelen patolojik değişimler aynıdır. İskelet kas dokusu dejenerasyon sürecinde, dejenerasyon patolojisinin engellenmesi amacı ile kas rejenerasyon mekanizmalarını arttırmaya yönelik (distrofin geninin düzeltilmesine yönelik genetik yaklaşımlar, kas rejenerasyonunun desteklenmesine yönelik hücresel tedaviler gibi) metodolojiler geliştirilmeye çalışılmıştır. Ancak bu tedavi metodolojilerine yönelik gerçekleştirilen klinik denemelerde yeterli rejeneratif cevabın oluşturulamadığı, dokuda meydana gelen fibrozisin genetik faktörlerin ve uygulanan hücrelerin dejenerasyon kas dokusuna nüfuz etmesini engellediği ve özellikle uygulanan hücrelerin doğal niş özelliklerini bozmaları nedeni ile yeterli etkinliği gösteremedikleri gözlenmiştir. Bu kapsamda iskelet kas dokusunda hücresel ve moleküler fibrozis gelişim mekanizmalarının çözümlenmesine yönelik çalışmalar, yeni tedavi metodolojilerinin geliştirilmesi ve mevcut metodolojilerin etkinliğinin artırılmasına yönelik yeni yaklaşımların geliştirilmesi için önem taşımaktadır. 2010 senesinde fibrozisin hücresel gelişim mekanizmasına yönelik gerçekleştirilen mekanistik çalışmada mezenkimal kök hücre kökenli "fibroadipojenik progenitör (FAP)" hücreleri yüzey belirteçleri ile birlikte tanımlanmıştır. FAP hücreleri inflamatuvar ve endotel hücre belirteçleri yönünden negatifken CD140a(+), Sca1(+) ve CD140a(+)/Sca1(+) yönünden pozitiflik göstermektedir. Aynı zamanda FAP hücrelerinin aktivasyonu ve sayısal regülasyonunun inflamasyon ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir. Ancak kas dejenerasyon tiplerinin tamamında inflamatuvar hücre yanıtı meydana gelmemektedir. Bu noktadan yola çıkarak ilgili tez çalışmasında, farklı dejenerasyon patoloji bulgularını sergileyen deney hayvanı modellerinde stromal hücre popülasyonlarının (CD140a(+)/Sca1(-), CD140a(-)/Sca1(+) ve CD140a(+)/Sca1(+)) değişim dinamiği incelenmiş olup, stromal hücre aktivasyonu ile inflamasyon ilişkisi

araştırılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda, inflamasyondan bağımsız aktivasyon gösteren CD140a(-)/Sca1(+) hücre populasyonunun ECM'in düzenlenmesi ve hücrelerin fibrozis gelişimine katkısı yüksek lekli RNA sekanslama metodolojisi ile araştırılmıştır. Tez alışması kapsamında, kas dokusu dejenerasyon sürecinde, patoloji gelişimine katkı sağlayan stromal hücre grupları incelenmiş olup, farklı dejenerasyon patolojilerinde farklı stromal hücre gruplarının fibrozis sürecine katkı sağladığına yönelik bilimsel bulgular elde edilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 İskelet Kas Dokusunun Genel Özellikleri

İskelet kas dokusu somatik sinir sistemi tarafından uyarılarak gerçekleştirilmiş olduğu mekanik aktivasyon ile vücut hareketini sağlayan ana birimdir. Toplam vücut kütlelerinin yarısından fazlasını oluşturmaktadır. Embriyonik gelişim sürecinde somitlerden köken alan öncül kas hücrelerinin füzyon ile bir araya gelmesiyle çok çekirdekli kas lifleri oluşur. Bu kas liflerinin her birinin tek bir motor nöron ile inerve edilmesi ile motor unite oluşur(1). Motor ünite ile birlikte, bu lifler kas dokusunun en küçük birimini oluşturur. Birden çok kas lifi endomysium adı verilen bağ doku ile demetler halinde bir arada tutulur. Endomysium ile sarılı birden çok kas lifinin perimysium adı verilen ikincil bir bağ doku ile demetler halinde bir arada tutulması ile kas fasikülü oluşur. Tüm kas fasiküllerini bir arada tutan bağ doku ise dokunun en dışında bulunur ve epimysium olarak adlandırılır (Bkz. Şekil:2.1). Embriyonik gelişim sürecinde tek çekirdekli öncül hücrelerin çok çekirdekli kas liflerini oluşturması ve oluşan bu kas liflerinin bağ doku ile demetler halinde paketlenmesi sonucunda iskelet kas dokusu gelişimi tamamlanır (2, 3).



**Şekil 2.1:** İskelet kas dokusunun genel yapısı(4)

İskelet kas dokusunun temel kasılma birimi, aktin ve miyozin proteinlerinden oluşan sarkomerdir. Sarkomer yapılarına gerekli mekanik uyarımın oluşması için doku inervasyonu ve sitoplazmaya kalsiyum salınımının gerçekleşmesi gerekmektedir. Sinir

hücreleri kası inerve ederek kas-sinir kavşağını oluşturur. Gelen uyarım nörotransmitterler (asetilkolin) aracılığı ile asetil kolin bağımlı kanal proteinlerinin aktivasyonu meydana gelir. Kanal proteinine asetil kolinin bağlanması ile sarkolemmada lokal depolarizasyon meydana gelir. Bu depolarizasyon ile voltaj-kapılı  $Na^{++}$  kanalları açılır ve  $Na^{++}$  hücre içine aktarılarak depolarizasyon sarkolemmaya yayılır. Bu depolarizasyon dalgası T tübüllere kadar yayılarak, T tübüllerde bulunan RYR1/RYR2 olarak adlandırılan  $Ca^{++}$  kapılı kanalların aktive olarak, sitoplazmaya kalsiyum salınımını gerçekleştirir(5). Serbest kalsiyum iyonları Troponin C'ye bağlanır ve aktin ve miyozin filamentlerinin arasında bulunan tropomiyozinin yerleşimi değişerek, aktin ve miyozin filamentleri birbirine bağlanır. Etkileşim ile birlikte ATP yıkımı ile birlikte aktinler miyozin üzerinde kayar. Kas lifi boyunca ardışık olarak dizili olan sarkomer yapılarının kasılması ile doku kasılır(6).

## 2.2 İskelet Kas Dokusunun İdamesi ve Rejenerasyonu

Kas dokusunda, dokunun rejenerasyonu ve idamesinden sorumlu ana hücre grubu, hücre membranı ve bazal lamina arasında konumlanmış olan satellit hücrelerdir(7). Bu hücreler normal fizyolojik koşullarda mitotik olarak sessizdir. Ancak dokuda herhangi bir hasarın meydana gelmesi ile aktive olarak, hasarlı kas lifi yapısına katılarak dokunun tamirini sağlamaktadır. Benzer bir şekilde sağlıklı bir kas dokusunda kas lifinde bulunan çekirdekler de mitotik olarak sessizdir. Dokunun kütlece artış göstermesi, diğer dokularda olduğu gibi dokuyu oluşturan hücrelerin mitotik bölünmesi ve sayıca artışı ile meydana gelmez. Kas lifi içinde bulunan miyofibril miktarının artırılması ile meydana gelmektedir. Sağlıklı kas dokusunda, doku idamesi için süreklilik içeren bir rejeneratif cevap bulunmamaktadır. Ancak, kas liflerinde yapısal protein eksiklikleri, konsantrik egzersiz, kimyasal ajanlar nedeniyle meydana gelen hasar sonucunda moleküler ve hücrel mekanizmaların aktive olmasıyla rejenerasyon cevabı tetiklenmektedir(8). Bu rejenerasyon sürecine eşlik eden üç farklı hücre grubu bulunmaktadır. Bunlar; inflamatuvar hücreler, satellit hücreler ve dokuda bulunan stromal hücrelerdir. Bahsedilen üç ana düzenleyici hücre popülasyonunun birbiri üzerine etki ettiği otokrin ve parakrin faktörler ile kas rejenerasyonu sağlanmakta olup, üç ana düzenleyici hücrenin dokuda belirli bir

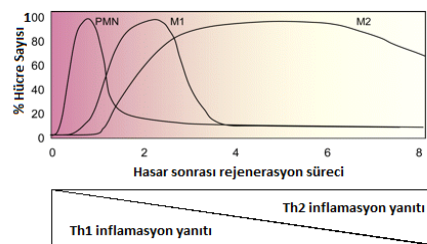
stokiyometrik oranda bulunması ile hasar gören kas lifinin tamir edilmesi, doku spesifik kök hücre havuzunun korunması ve dokunun yeniden modellenmesi için gerekli olan ekstraselüler mimarinin herhangi bir kalıcı hasar oluşturmadan gerçekleştiği gözlenmektedir. Dolayısıyla, bu süreçte rol alan hücrel düzenleyici mekanizmaların aksamasına neden olan etkenlere (yapısal protein eksikliğine bağlı yapım yıkım döngüsünün bozulması vb.) bağlı olarak rejenerasyonun tamamlanamadığı ve dokuda patolojik değişimlerin meydana geldiği gösterilmiştir. Bu patolojik değişimlerin başında, hasar sürecinde meydana gelen inflamatuvar hücre aktivasyon dinamiğindeki değişimler, kas lifi atrofisi ve artan ECM (*Ekstraselüler matriks*)'e bağlı fibrozis gelişimidir. Aşağıdaki bölümlerde rejenerasyon sürecinde görev alan inflamatuvar hücreler, kas dokusu hücrel bileşenleri ve fibrozisin moleküler gelişim mekanizması detaylı olarak özetlenmiştir (8).

### **2.2.1. Akut Kas Hasarı ve Rejenerasyon Sürecinde İnflamatuvar Hücrelerin Etkisi**

Akut kas hasarı herhangi bir fiziksel ya da kimyasal bir etken varlığında kas liflerinin yapısal bütünlüğünün bozulması ile meydana gelen durumdur. Akut hasar ve rejenerasyon süreci üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlardan ilk aşama nekrozdur. Kas liflerinin parçalanması ve hücrel debrisin açığa çıkmasıyla inflamatuvar hücrelerin hasar bölgesine infiltre olduğu aşamadır. İkinci aşama tamir aşamasıdır. Doku nekrozu ile birlikte açığa çıkan faktörler satellit hücrelerin aktive olarak kas lifi yapımına katıldığı aşamadır. Bu süreçte merkezi çekirdekli yeni kas lifleri oluşmaya başlar. Son aşama ise dokunun yeniden yapılanma sürecidir. Bu süreçte yeni oluşan kas lifleri yeni kontraktıl elemanların yapılmasıyla olgunlaşırlar. Nekroz, tamir ve olgunlaşma süreci hasarın büyüklüğüne bağlı olmakla birlikte 10-14 günlük süreçte tamamlanmaktadır

Kas liflerinin membran bütünlüğünün bozulması sonucunda inflamatuvar hücre cevabı ortaya çıkmaktadır. Hasar bölgesine ilk olarak gelen inflamatuvar hücreler nötrofillerdir. İlk 24 saatlik süreçte infiltrasyon tamamlanır ve nötrofil cevabının devamında hasar bölgesine Th1 hücreleri gelir. Burada TNFa (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) ve interferon-gama salgılayarak fagositik makrofaj (M1 makrofajlar)

aktivitesini başlatır. M1 makrofajların temel görevi nekrotik doku parçalarının temizlenmesini sağlamaktır. Hasarı takip eden üç gün boyunca fagositik makrofajlar sitotoksik faktörlerin salınımına (Süperoksitdismütaz aktivasyonu ile hidrojenperoksit üretimi vb.) devam eder. Bu süreçte kas yıkımı bir süre daha sitotoksik faktörlere bağlı olarak devam eder. Ancak dokuda gerçekleşen her yeni hasara bağlı olarak satellit hücrelerin daha etkin aktive olmasını sağlayan nitrik oksit molekülünün salınımı ile tamir süreci desteklenmektedir. Akut hasarın 4. gününde giderek M1 makrofaj sayısı azalır ve hasar bölgesinde Th2 hücre aktivasyonu ile M1 makrofaj fenotipi, M2 fenotipine kayar. Makrofaj fenotip değişimi, Th2 hücre faktörleri ile gerçekleştiği gibi aynı zamanda ortamda bulunan apoptotik nötrofillerin salgıladıkları TGF-beta ile bu fenotip değişiminin meydana geldiği gösterilmiştir(9). Dolayısıyla hasar bölgesinde bulunan myeloid hücrelerin apoptozu sonucunda TNF-alfa ekspresyonunun azalması, TGF-beta ekspresyonunun artması ile bu fenotipik değişim meydana gelmektedir. M2 makrofajlar M1 makrofajların aksine TGF (Transforming Growth Factor)-beta, IL (interlökin)-4, IL(interlökin)-10 gibi anti-inflamatuar sitokinler salgılar. Bu aşamada M2 makrofajlarının görevi, oluşan inflamasyonu ve inflamasyona bağlı doku içinde gerçekleşen cevabı baskılayıp, dokunun rejenerasyon sürecini tamamlamasına yardımcı olmaktır (Bkz.Şekil:2.2). Rejenerasyon sürecinde inflamasyonun devam etmesi, sitotoksik hücre cevabının devam etmesine neden olacağından bir süre sonra dokuya zarar vermeye başlayacaktır. Bu cevabın M2 makrofajlarca hasardan sonraki 4. gün ve devamında baskılanmasıyla dokuda yeni oluşan kas liflerinin olgunlaşması ve bu durumla ilişkili olarak yeni bir ekstraselüler matriks (ECM) yapılanması gerçekleşerek 14-21 günlük sürede kas yenilenmesi tamamlanmaktadır (9, 10).



**Şekil 2.2:** Akut hasar sonrası tamir sürecine inflamatuvar hücrelerin rolleri (10)



### 2.2.2 Kronik Kas Dejenerasyonu ve İnflamatuar Hücrelerin Etkisi

Kronik kas dejenerasyonu, dokuda bulunan fonksiyonel proteinlerin kaybına bağlı olarak, dokunun ana ünitesi olan kas liflerinin ilerleyici yönde hasar görmesi ve rejenerasyon yanıtının yetersiz kalması ile kas lifi atrofi, artan ekstraselüler matriks (ECM) ile karakterize olan kronik ve ilerleyici bir patolojidir. Bu hastalıklar kas distrofileri olarak adlandırılmakta olup, patolojileri kas lifi atrofi ve fibrozistir. Duchenne kas distrofi (DMD), konjenital kas distrofileri ve diğerlerinde, yapısal protein eksikliğine bağlı olarak kasılma sonucu oluşan mekanik stresin ECM'e aktarılamamasına bağlı olarak ilerleyici kas yıkımı meydana gelmektedir. Bu durum hasarla birlikte inflamatuvar hücresel yanıtın başlamasına neden olur. Genetik kas miyopatilerinde oluşan dejenerasyon sürecine, akut hasar sonrası rejenerasyonda gözlenen nötrofillerin, mast hücrelerinin ve sitotoksik T hücrelerin sürece katıldığı gözlenmiştir. Ancak hasar tamirinin önemli bir basamağı olan makrofaj fenotip değişiminin kronik hasar sürecinde ne yönde etkilendiği araştırılmıştır. Duchenne kas distrofi hayvan modeli olan mdx farelerde makrofaj hücre sayısının azaltılmasına yönelik uygulanan genetik ve farmakolojik (kortikosteroid ve immunsupresan uygulaması) yaklaşımlarda patoloji gelişiminin yavaşlamış olduğu, bu nedenle makrofajların kronik kas hasarında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (11, 12). Kronik dejenerasyonun erken döneminde (mdx farede ilk 4 haftalık süreci kapsar) dokuda meydana gelen hücresel aktivasyon, akut hasar sürecinde meydana gelen inflamatuvar hücre yanıt ile aynıdır. Hasarın erken döneminde Th1 ve M1 makrofajlar bulunmaktayken, ilerleyen süreçte ortama Th2 hücreleri gelir ve M2 makrofaj profili oluşmaya başlar. M2 makrofajlar, M1 makrofajlar gibi arginin bağımlıdır. Ortamda hangi makrofaj fenotipinin ağırlık kazanacağı aralarındaki substrat yarışı ve M2 makrofajların, M1'leri baskılamak için kullandığı IL-4 ve IL-10 faktörlerine bağlılık göstermektedir. Dokudaki makrofaj fenotip değişiminin yarışımına bağlı olması kronik hasar sürecinde hücre fenotipinin M1 yönüne kaymasına ve M2 fenotipinin baskılanmasına neden olmaktadır (13). Akut hasar ile kronik hasar arasındaki inflamatuvar hücre tipleri yönünden meydana gelen farklılığının bir diğer sebebi olarak, alloreaktif T hücre varlığının neden olduğu düşünülmektedir. Mdx fare

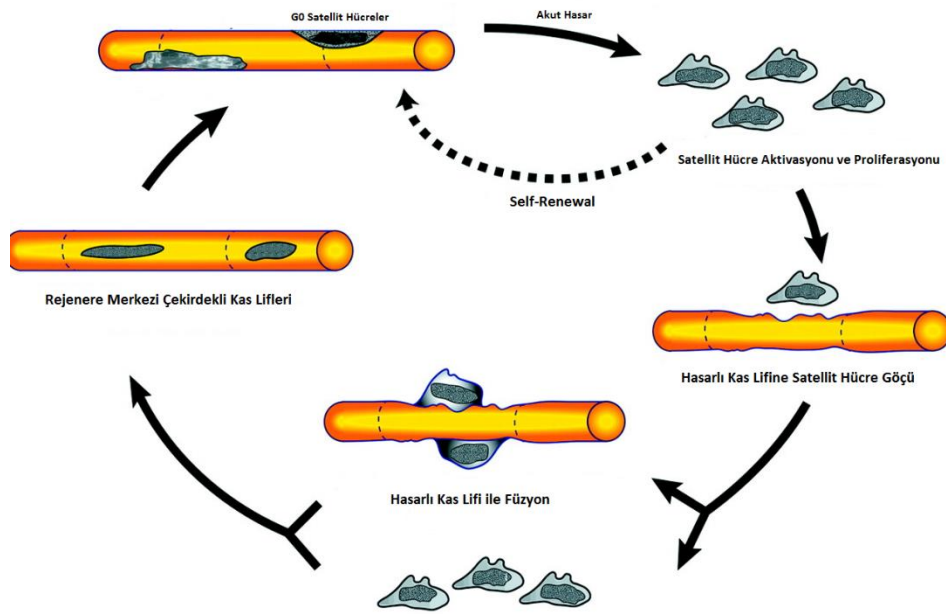
ile gerçekleştirilen çalışmalarda hastalığın ilerleyen sürecinde dokuda alloreaktif T hücrelere bağlı inflamatuvar yanıtın oluştuğu gözlenmiştir. Duchenne hastalarının kas dokularında spesifik T hücre reseptör yeniden düzenlemesinin meydana geldiğinin gösterilmiş olması, muhtemel durumun Duchenne hastalarında da olduğunu düşündürmektedir (14, 15).

## **2.1 Kas Dokusunun Hücresel Bileşenleri**

### **2.3.1 Miyojenik Farklılaşma Özelliği Bulunan Kök/Projenitör Hücreler**

#### **a. Satelit Hücreler:**

Kas dokusunun rejenerasyonundan sorumlu ana kök hücre grubu her bir kas lifinde bazal membran ve kas lifi plazma zarı arasında konumlanmış olan satelit hücreler tarafından sağlanmaktadır. Fizyolojik koşullar altında mitotik olarak sessiz bulunan satelit hücreler kas liflerinin yapısının bozulmasına bağlı gelişen hasar durumunda ekstraselüler matrikste bulunan matriks bağımlı proteaz aktivasyonu, hasar bölgesine gelen inflamatuvar hücrelerin salgıladıkları faktörler olmak üzere bir seri otokrin ve parakrin faktör varlığında aktive olmaktadır. Bu faktörlerden en önemlisi nitrikoksit (NO) ve hasar durumunda nitrikoksit sentaz (NOS) enziminin aktivasyonu ile oluşturulur (16). Molekülün gaz fazında olması nedeniyle hücre zarından difüzyon aracılığı ile geçerek satelit hücre aktivasyonunun sağlanmasında rol alan ilk sinyal molekülüdür. Bu aktivasyondan sonraki süreçte, fonksiyonel olarak kas yenilenmesine katılmada etkili rol üstlenen, notch sinyal yolağı ligandları, hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve IL-6 gibi faktörlerin salgı idamesini sağlayarak, hücrelerin tamir sürecinde etkin rol almasını sağlamaktadır (17). Aktive olan satelit hücreler asimetrik bölünme ile sayıca çoğalırlar. Bir kısmı satelit hücre havuzunun korunması için niş bölgesine yerleşir. Diğer hücreler hasarlı kas liflerinin yapısına füzyon mekanizması ile katılarak kas lifinin tamir edilmesini sağlamaktadır (Bkz. Şekil2.3).



Şekil 2. 3: Satelit hücre aktivasyonu ve kas tamiri (18)

#### b. PW1<sup>+</sup> Hücreler

Kas dokusu rejenerasyonunda kas lifi oluşumundan sorumlu ana hücre grubu satelit hücrelerdir. Ancak, dokuda endomisial yerleşim gösteren ve miyojenik farklılaşma potansiyeli bulunan farklı bir hücre grubu daha tanımlanmıştır. Bu hücreler gerek dokuda yerleşim alanları, gerek taşıdıkları yüzey belirteçleri yönünden satelit hücrelere göre farklılık taşımaktadır. Satelit hücreler CD56(+)/Pax7(+) olmaları ve spesifik doku yerleşimleri ile tanımlanırlarken, PW1(+) hücreler endomisial yerleşimleri ve PW1(+)/Pax7(-)/CD34(+)/CD31(-) olmaları ile karakterizedir (19). Bahsedilen belirteçler ile izole edilen PW1(+) hücreler in vitro ortamda spontan miyojenik farklılaşma gösterdiği gibi izole edildikten sonra hasar bölgesine enjekte edildiğinde kas lifi yapısına katılabildiği gözlenmiştir (20). Endotel belirteç taşımayan olması, Pax7 'den bağımsız miyojenik farklılaşma gösterip in vivo rejenerasyona katılıyor olması bu hücrelerin kökenine yönelik soruları beraberinde getirmektedir.

### 2.3.2 Miyojenik Farklılaşma Özelliği Bulunmayan Kök/Projenitör Hücreler

Bilim insanları son 20 yılda iskelet kası hastalıklarına yönelik tedavi metodolojilerinin miyojenik farklılaşmanın artırılması üzerine kurgulamıştır. Dejeneratif kas hastalıklarında kas yapım-yıkım dengesi tedavi için önemli bir yaklaşımdır. Ancak yapılan sayısız çalışmada gerek hücresel gerek genetik tedavi yaklaşımlarının kas dokusu rejenerasyonunu yeterince sağlayamadığını gösterilmiştir (21-23). Bunun temel sebebi olarak dejeneratif kas dokusunda gelişen fibrozisin bariyer etkisi nedeniyle, doku bütünlüğünün bozulmuş olması ve uygulanan hücre, nötralizan antikor ve genetik faktörlerin dokunun ilgili bölümlerine ulaşamadığı ortaya konmuştur. Bu çalışmalar sonucunda bilim insanları rejenerasyon ve dejenerasyon sürecinde rol alan stromal değişikliklere odaklanmış olup, kas hastalıklarına yönelik geliştirilen tedavi yöntemlerinin başında fibrozisin engellenmesine yönelik çalışmaların yer alması gerektiği anlaşılmıştır. Bu noktadan yola çıkarak araştırmacılar iskelet kasına farklılaşma potansiyeli olan yeni kök hücre gruplarının keşfi yerine dejenerasyon sürecinde meydana gelen fibrozisin hücresel ve moleküler gelişim mekanizmalarının çözümlenmesine yönelik çalışmalara hız vermiştir.

İskelet kası yapısını oluşturan kas lifleri, kas sinir birimi, kan damarları ve doku spesifik kök hücreleri dışında endomisial ve perimisial yerleşim gösteren miyojenik yönde farklılaşma göstermeyen hücre grubundan oluşmaktadır (24). Bu hücreler doku tamiri sırasında ekstraselüler matriksin yeniden modellenmesinde görev aldığı gibi aynı zamanda salgıladıkları faktörler ile rejenerasyon sürecine önemli ölçüde katkı sağlamaktadırlar. Bu hücrelerden biri Tcf4(+) bağ doku fibroblastları ve bipotent farklılaşma özelliği gösteren fibroadipojenik projenitörler (FAP)'dir.

#### a. Tcf4(+) Bağ Doku Fibroblastları

Tcf4(+) bağ doku hücreleri endomisial alanda bulunan ve kas dokusunda dejenerasyon/rejenerasyon sürecinde ekstraselüler matriks yapımına katkı sağlayarak, dokunun yeniden modellenmesine yardımcı olan bir hücre grubudur. Tcf4(+) hücrelerin gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda, bu hücrelerin miyojenik

farklılaşma göstermediği ancak deplesyonu durumunda kas rejenerasyonunun tamamlanması için önemli bir hücre grubu olduğu gözlenmiştir. Cre/Lox sistemi ile Tcf4 gen hedeflemesi yapılarak dokuda bu hücrelerin sayıca azaltılması sonucunda rejenerasyon süresinin uzadığı ve kas liflerinin etkin bir şekilde rejenere olamadığı gözlenmiştir. Tcf4(+) hücreler rejenerasyon sürecine doğrudan kendileri katılmazken, salgıladıkları faktörler ile kas gelişimine önemli ölçüde katkı sağladığı gerçekleştirilen *in vitro* ko-kültür çalışmaları ile gösterilmiştir (25). Bu hücrelere yönelik bilgi kısıtlı olmakla birlikte, bu yönde çalışmalar devam etmektedir.

#### **b. Fibroadipojenik Projenitörler (FAP)**

İlk olarak 2010 senesinde tanımlanmış olup, fibroblast ve adiposit farklılaşması gösteren bipotent bir kök hücre grubudur (26, 27). Hücrelerin tanımlanmasında yüzey belirteçleri kullanılmıştır. Her geçen gün bu hücrelerle ilgili yeni bir belirteç paneli belirlenmekte olup, araştırmacıların FAP hücre çalışmalarında kullandıkları belirteç paneli “CD11b(-)/CD31(-)/CD45(-)/CD140a(PDGFRa)(+)/Sca1(+)” şeklindedir (28). FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) yöntemi ile izole edilen FAP hücrelerinin *in vitro* koşullar altında spontan adipojenik ve fibroblast farklılaşması gösterdikleri, *in vivo* koşullar altında ise gliserol aracılı enjeksiyonunda doku içi yağ oluşumunu, GFP ile işaretlendiğinde kronik dejenerasyon sürecinde fibrozis odaklarında çoğaldığı ve tip-I kollajen sentezlediği gözlenmiştir (29). Kas dokusu fizyolojisinde gerçekleştirilen lokalizasyon çalışmalarında FAP’ların kas lifi, kan damarı komşuluğunda konumlandığı gözlenmiştir. Lokalizasyonu nedeniyle ilk olarak endotel kökenli olduğu düşünülen FAP hücrelerinin endotel belirteçleri taşıması nedeniyle endotel kökenli olmadığı ortaya konmuştur. *In vitro* çalışmalarda FAP’ların osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma göstermesi, hücrelerin mezenkimal kök hücre kökenli olduğunu kanıtlamıştır (27). *In vivo* koşullarda rejenerasyon sürecinde FAP’ların kas yapısına katılıp, katılmadığının ve fibrozis sürecine olan katkısının araştırılması amacı ile ışınlanarak (*irradiated*) satellit hücrelerden arındırılmış kas dokusuna, kardiyotoksin enjekte edildikten sonra GFP (*Green Fluorescent Protein*)-PDGFRa işaretli FAP hücrelerinin fibrozis odaklarında bulunduğu ve sayıca çoğaldıkları gözlenmiştir (30). Gerçekleştirilen bu çalışmalar sonucunda

FAP'ların rejenerasyon sürecinde miyojenik farklılaşma göstermediği, tamir edilen kas lifi yapısına katılmadığı gösterilmiştir (30).

FAP hücrelerinin kas gelişimi ve rejenerasyon sürecine olan etkisinin araştırılması amacı ile gerçekleştirilen çalışmalarda, miyoblast hücreleri ile FAP hücreleri birlikte kültüre edildiğinde miyoblast idamesi ve farklılaşmasını indüklediği gözlenmiştir. Transgenik fare modelinde (PDGF $\alpha$ /CD140a *conditioned knock out*) ise FAP hücre deplesyonu durumunda rejenerasyonun tamamlanamadığı gözlenmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmalar sonucunda FAP hücrelerinin doku fizyolojisini hücreyel olmayan mekanizmalar üzerinden düzenlediği ve sağlıklı kas dokusu için bu hücrelerin var olması gerektiği saptanmıştır (31)

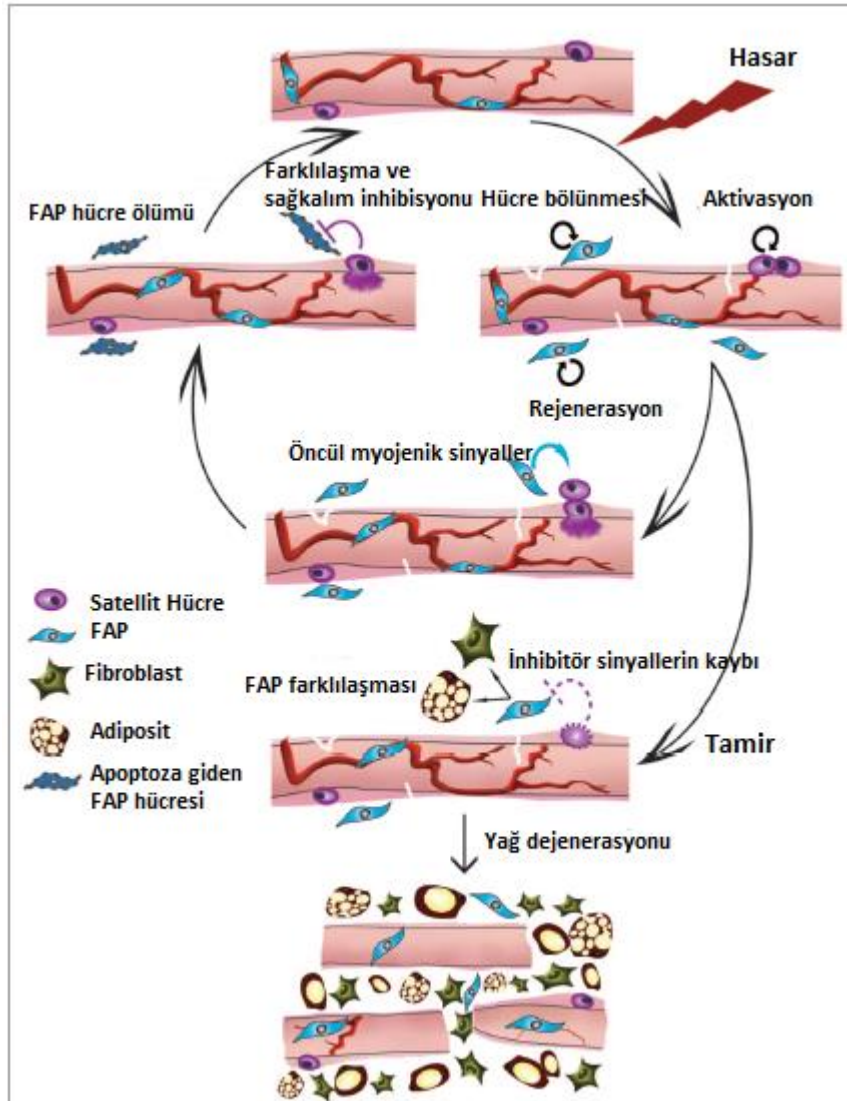
Sağlıklı kas dokusunda FAP hücre popülasyonu yaklaşık %1 oranında bulunmaktadır. Akut hasar sonrası tamir sürecinde zamana bağlı FAP hücre sayısı değişimi incelendiğinde hücrelerin hasar sonrası 3. gün sayıca 10 kattan fazla artış gösterdiği, tamir sürecinin 10-14. gününde ise FAP sayısının kontrol sayısındaki değere ulaştığı gösterilmiştir. Gerçekleştirilen araştırma sonucunda hücrelerin maksimum sayıya ulaştığı sürecin, aynı zamanda sitotoksik inflamatuvar hücrelerin hasar bölgesinde maksimum sayıda bulunduğu süreçle ilişkili olarak artış gösterdiği, sitotoksik T lenfositlerin ortamdan çekilmeye başladığı sürede de FAP hücrelerinin bu değişime uyumlu olarak sayıca azaldıkları gözlenmiştir (32). Elde edilen bu bulgular sonucunda rejenerasyon sürecinde FAP hücre sayısının inflamatuvar hücreler tarafından düzenlendiği hipotezinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Rossi ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda, FAP hücrelerinin inflamatuvar hücreler tarafından salgılanan ana faktörler (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-6, TGF- $\beta$  vb.) varlığında ne gibi fizyolojik değişimler gösterdiği araştırılmıştır. İzole edilen FAP hücreleri TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  ve IL-6 ile birlikte kültüre edildiğinde sadece TNF- $\alpha$  varlığında hücrelerin apoptoza gittiği gözlenmiştir. Bu sonuç hasar sonrası 3. gün dokuya infiltre olan sitotoksik inflamatuvar hücre salgısı TNF- $\alpha$ 'nın FAP apoptozunu indüklediğini ve 3. günden sonra hücre sayısında azalış olmasını sağladığını göstermiştir. Akut hasar sonrası tamir sürecinde sitotoksik hücre fenotipinin, sitotoksik olmayan hücre hücre fenotipine geçişte hakim olan iki ana

faktör bulunmaktadır. TNF-alfa sitotoksik hücreler tarafından (M1 makrofaj) salgılanmaktadır. M1 makrofaj fenotipinin, sitotoksik olmayan M2 makrofaj fenotipine dönüşmesiyle hasar bölgesinde TGF-beta faktörü hakim olmaya başlamaktadır. Rejenerasyon sürecinde hakim olan TGF-Beta'nın FAP hücrelerine olan etkisi araştırıldığında, hücrelerde anti-apoptotik yolak aktivasyonunun meydana geldiği gözlenmiştir. TNF-alfa aracılı apoptoz ile sayıca azaltılan FAP hücrelerinin TGF-beta aracılığı ile idamesinin sağlandığı gösterilmiştir. Elde edilen bu bulgular, hasar sonrası tamir sürecinde FAP hücrelerinin sayıca artış göstererek rejenerasyon sürecinde dokunun yeniden modellenmesinde görevli olduğunu, yeterli rejeneratif yanıtın (M1, M2 makrofaj fenotip değişimi) oluşmasıyla sayısının azaltılarak dengede tutulduğu anlaşılmıştır (32).

Akut hasar sonrası tamir sürecinde FAP hücre regülasyonu TNF-alfa ve TGF-beta kontrolü altındadır. Ancak kronik kas hasarı sürecinde fibrozis gelişiminin ana düzenleyicisi olan TGF-beta'dır. Mdx fare doku kesitlerinde FAP hücrelerini sayısal artış gösterdiği ve fibrotik alanlarda FAP hücrelerinin konumlanmış olması bu hücrelerin dokuda fibroze neden olan hücreler olduğunu göstermiştir. Tetiklenen fibrozis süreci ile FAP hücreleri TGF-beta sinyali varlığında idame edilmekte ve sayıca artış göstererek fibrozisi tetiklemektedir (32).

FAP hücrelerinin keşfi ile birlikte anti-fibrotik tedavi stratejileri için yeni bir hedef hücre grubu ortaya konmuştur. Kas rejenerasyonunun tetiklenmesinin başında fibrozisin engellenmesi geldiği için bu hücreler tedaviye yönelik yaklaşımların geliştirilmesinde ana odak noktasını oluşturmuştur. FAP hücrelerini hedefleyen yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için öncelikle hücrelerin aktivasyon mekanizmasına yönelik yolların keşfedilmesi gerekmektedir. FAP hücrelerinin en temel belirteci PDGFRa (CD140a) reseptörüdür. Dolayısıyla araştırmacılar öncelikle FAP hücrelerinin PDGFRa üzerinden aktivasyonunu engellemeye yönelik yaklaşımlarda bulunmuşlardır. PDGFRa tirozin kinaz ailesi üyesidir ve ligand ile bağlandığında tirozin kinaz aktivitesi ile ilgili aşağı moleküler yolları aktive etmektedir. FAP hücrelerinin tirozin kinaz bağımlı aktivasyonu, tirozin kinaz

inhibitörleri ile fibrozisin engellenebileceğine yönelik hipotezlerin oluşmasını sağlamıştır.



**Şekil 2.4:** Akut hasar ve kronik dejenerasyonda FAP regülasyon şeması (31)

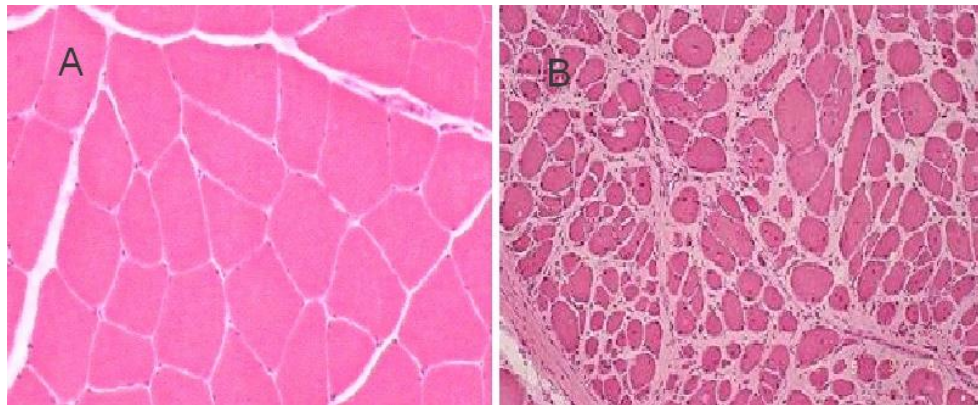
İlk olarak Rossi ve arkadaşları tarafından Mdx fare modeline, klinikte yaygın olarak kullanılan bir tirozin kinaz inhibitörü olan Nilotinib'in enjeksiyonu ile fibrozis odaklarının sınırlandırıldığı gösterilmiştir (32). Yalnız Nilotinib değil, aynı zamanda klinikte kullanılan diğer tirozin-kinaz inhibitörlerinin de FAP temelli fibrozis tedavilerinde kullanılabileceği düşünülmektedir (33). FAP hücre regülasyonunda PDGFRa (CD140a) temelli regülasyonun hangi moleküler mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği araştırıldığında, akut hasar sonrası tamir sürecinin ilk 4 günlük sürecinde



tam uzunlukta (180kDa) PDGFRa ekprese edildiği, FAP aktivasyonu ile birlikte PDGFRa ekspresyon sürecinde alternatif poliadenilasyonun meydana geldiği ve G0 fazında bulunan PDGFRa'dan (180 kDa) daha düşük molekül ağırlığına (120kDa) sahip proteinin oluştuğu gözlenmiştir. İntronik poliadenilasyon mekanizması ile reseptörün kinaz domaini kısaltılarak işlevini kaybetmesi sağlanmaktadır. Bu kapsamda, FAP aktivasyonu sonrasında PDGFRa uyarımının sonlandırılması ile aşağı yollarda fibrotik gen ekspresyonları baskılanmaktadır (34). Böylece, FAP hücre aktivasyonu ile doku tamiri gerçekleştirilirken, belirli bir aşamadan sonra hücrelerin uyarımlanması engellenerek patolojik oluşumların önüne geçilmektedir. Aynı çalışmada *anti-sens* morfolino uygulaması ile hem uzun hem de kısa form PDGFRa oluşumunun engellenmesi ile fibrozisin tetiklendiği ve engellendiği gösterilmiştir. Bu nedenle FAP temelli fibrozis tedavisinde tirozin kinaz inhibitörlerine alternatif olarak, *anti-sense* morfolinoların da kullanılabilmesi gösterilmiştir.

#### 2.4 Fibrozisin Hücresel ve Moleküler Gelişim Mekanizması

Fibrozis dokuda ECM miktarının artması ile meydana gelen patolojik bir durumdur. Normal fizyolojik koşullarda ECM dokunun destek birimi değil aynı zamanda dokunun lokomotor aktivitesini gerçekleştirebilmesi için de gereklidir. Özellikle de iskelet kas dokusunun mekanik fonksiyonu ve idamesi için oldukça önem taşımaktadır. Ancak, iskelet kas dokusunun mikroskopik incelemesi yapıldığında ECM miktarının tüm doku içindeki oranının %5 olduğu gözlenmektedir (35). Bu oransal dağılım dokunun idamesi, mekanik aktivitesi için gerekli fizyolojiyi sağlamaktadır.



**Şekil 2.5:** A Sağlıklı kas dokusu. B Duchenne Kas Distrofisi kas dokusu (36)

Kas dokusunda ECM'in molekül yapısı incelendiğinde kollajen tip1 ve 3 yönünden zengin bir yapıda olduğu, tip 4 kollajenin kas lifi bazal membran yapısında bulunduğu gözlenmiştir. Kas lifleri ve ECM arasındaki bağlantı ise fokal adezyon molekülleri ile sağlanmaktadır. Bu yapısal proteinler içinde en önemlisi distroglukan kompleksidir. ECM bileşenlerine ve kas lifi ile ilişkisine bakıldığında, ECM'in dokunun bütünleyici bir parçası olduğu gözlenmektedir (37). Sadece genetik kökenli kas dejenerasyonunda değil, dokunun kullanıma bağlı değişimlerinde de (tenotomi, denervasyon, spinal cord hasarı, yaşlılık vb.) ECM miktarı artarak fibrozis gelişmektedir (38). Fibrozis gelişiminin çok erken döneminde bu patolojik değişim geçici olabilmektedir. Ancak ilerleyen fibrozis süreci geri dönüşümsüz olup kronik olarak artış göstererek doku esnekliğinin kaybolması ve kaybolan esnekliğe bağlı olarak kas lifinin mekanik işlevinin kısıtlanması sonucu kas lifi atrofi meydana gelmektedir. Fibrozis gelişiminde iki ana mediyatör bulunmaktadır. Bunlardan birincisi kas lifi veya inflamatuvar hücrelerden salgılanan pro-fibrotik faktörler ve dokuda bulunan stromal hücrelerdir. Dokudan salgılanan pro-fibrotik faktörlerin başında TGF (*Transforming Growth Factor*)-beta 1 gelmektedir (39). Özünde etki ettiği hücre tipine göre işlevi (pleiotropik etki) farklılık göstermekle beraber, dejenerasyon sürecinde inflamatuvar hücrelerden salgılanarak, stromada fibrozis başlatıcı hücrelerin (FAP hücreleri, doku fibroblastları vb.), reseptörüne bağlanarak Smad 3 fosforilasyonu üzerinden yolak aktivasyonu gerçekleşir. TGF-beta sinyal yolağı aktivasyonu ile dokuda bulunan stromal hücrelerde (fibroadipojenik progenitörler, bağ doku fibroblastları) kolajen-I sentez artışı ve dokuda bulunan hücrelerin fibroblastta dönüşümü ile fibrozis süreci tetiklenmiş olur (40). Fibrozis patofizyolojisinde TGF-beta sinyal yolağının ana düzenleyici rol oynaması anti-TGF-beta temelli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen klinik denemelerde geliştirilen inhibitör moleküllerin yan etkiler göstermesi nedeni ile tedavi şekli yürürlüğe girememiştir (41-43). Bu nedenle TGF-beta inhibisyonuna ek olarak, fibrozisin dokuda başlatılmasına neden olan hücre grupları üzerine çalışmalara yön

verilmiştir. Aşağıdaki bölümde stromal hücreler ve fibrozis ilişkisi detaylı olarak anlatılmıştır.

## 2.5 İskelet Kası Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri

### 2.5.1 Genetik Modeller

İskelet kas hastalıklarının modellenmesinde genetik modeller kullanılabilir. Bu modellerin ortak özellikleri hastalığa neden olan gende meydana getirilen mutasyonlar aracılığı ile hastalık fenotipinin oluşturulmasıdır. Bu kapsamda en sık kullanılan model mdx fare modelidir. Duchenne kas distrofisinin modellenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Distrofin geninde bulunan nokta mutasyonu nedeniyle normalden kısa distrofin üretimi mevcuttur. *Mdx* fare iskelet kas dejenerasyonu incelendiğinde, iskelet kas dokusunun yoğun olarak etkilenmediği bu nedenle insan patoloji bulgularını tam olarak karşılayamadığı gösterilmiştir. Ancak, kas distrofisini en iyi yansıtan kas grubu diyafram kasıdır. Bu nedenle araştırmacılar ağırlıklı olarak bu modeli kullanırken diyafram kası üzerinden araştırmalarını sürdürmektedir(44). Duchenne kas distrofisi hayvan modelinden bir diğeri ise *GRMD* (*Golden retriever muscular dystrophy*) köpek modelidir. Distrofin geninde *splice* mutasyonu protein üretimi engellenerek oluşturulan bir modeldir. İnsanlarda zamana bağlı olarak meydana gelen patolojik değişimi en iyi gösteren hayvan modelidir. İskelet kas dokusu insanda olduğu gibi atrofi ve yaygın fibrozis bulguları gösterirken, hastalığın ilerleyen sürecinde diyafram kasının etkilenmesi ile solunumun durması ve kalp yetmezliğine bağlı ölüm meydana gelmektedir. *GRMD* modeli, Duchenne kas distrofisinin modellenmesinde üstünlük göstermesine rağmen ulaşım, idame kolaylığı ve etik nedenlerden dolayı araştırmalarda *mdx* fare modeli kullanılmaktadır. *GRMD* modelinin kullanımı, klinik denemeye girecek olan tedavi yöntemleri ile sınırlandırılmıştır (45).

### 2.5.2 Akut Hasar Modeli

Model, iskelet kasında hasar sonrası rejenerasyon cevabının oluşturulması ve bu sürece eşlik eden hücrel ve moleküler düzenleyicilerin araştırılması amacı ile uygulanmaktadır. Akut hasar oluşturmada en çok kullanılan yöntem kas içine miyotoksin enjeksiyonudur. Bu kapsamda en sık kullanılan toksinler noteksin ve kardiyotoksindir. Genel özellikleri fosfolipaz A2 türevi peptid yapılarını içermesi ve kas içine enjeksiyonu ile kalsiyum bağımlı proteaz cevabını başlatarak, kas liflerinin parçalanmasını sağlamaktır. Dokunun yapısal bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte inflamasyon ve bunu takip eden süreçte dokunun yenilenmesiyle ilişkili hücrel ve moleküler sinyal mekanizmaları aktive olarak 14-21 günlük süreçte doku tamiri tamamlanır (8).

### 2.5.3 Hareketsizleştirme Modelleri

#### a. Tenotomi

Kas dokusunun ana mekanik gücünü sağlayan tendonda meydana getirilen kesi ile oluşturulmaktadır. Dokuda kronik hasar sürecinde inflamasyondan bağımsız olarak eşlik eden patolojik olayların araştırılması amacı ile uygulanmaktadır. Tendon kesisi sonucunda ilgili kasa sinir uyarısının devam etmesine rağmen kas kasılamaz. Bu duruma bağlı olarak kas liflerinde atrofi ve fibrozis meydana gelmektedir. Bu amaçla en sık kullanılan hayvan modelleri sıçan ve faredir. Tenotomi modeli alt ekstremite kaslarında oluşturulmakta olup, en sık kullanılan yöntem aşil tendon ve anterio tibial tendon kesisidir. Aşil tendon kesisinde etkilenen kas grubu *Gastrocnemius* ve *Soleus*'tur. Anterior tibial tendon kesisinde ise *Tibialis anterior* kası etkilenmektedir. Tendon kesisini takip eden 7 günlük süreçte erken fibrotik değişiklikler meydana gelmektedir. İlk bir haftalık sürecin devamında atrofi ve fibrozis devam etmektedir (46, 47).

#### b. Denervasyon

İskelet kas dokusunun kasılmasını sağlayan ana uyarım motor nöronlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Kasa ilgili uyarımın gelmesini takiben mekanik uyarımın (hareketin) gerçekleşebilmesi için kuvvetin uygulanacağı tendon destek

noktasına da ihtiyaç bulunmaktadır. Bu yönü kasın etkin bir şekilde kasılabilmesi için hem tendon yapısına hem de sinirsel uyarıya beraber ihtiyaç duyulmaktadır. Kas dokusunun ana uyarıcısının sinir yapısı olması nedeniyle, bu iletişimin kesilmesi durumunda ilgili kasılma uyarısı oluşmamaktadır. Zamanla kasılmayan (kullanılmayan) dokuda patolojik değişiklikler meydana gelmeye başlamaktadır. Kronik kas hastalık modeli oluşturma ve süreçte meydana gelen patolojik değişikliklerin incelenmesi amacı ile sinir kesisi yaklaşımları uygulanmaktadır. Uygulanan bu model motor nöron hastalıklarının (*SMA -spinal muscular atrophy*, *ALS Amyotrophic lateral sclerosis* vb.) modellenmesi için uygulanmaktadır. Bu kapsamda tanımlanmış en iyi model siyatik sinir kesisi ile alt ekstremitte kaslarının etkilenmesini sağlamaktır. Siyatik sinirin büyük ve kolay bulunabildiği için araştırmacılara modelin kolay bir şekilde uygulanmasına yönelik avantaj sağlamaktadır. Siyatik sinir kesisini takiben alt ekstremitte uyarımı ortadan kalktığı için hayvan kesinin yapıldığı ekstremitteyi hissedemez ve kullanamaz. Denervasyon ile birlikte ilgili ekstremitte kullanılmadığı için tüm kas grupları etkilenmektedir. Ancak bu süreçte en çok etkilenen kas grubunun *Gastrocnemius* ve *Soleus* olduğu gösterilmiştir. Kesiyi takip eden ilk 10 günlük süreçte erken patolojik değişimler gözlenmeye başlar. Kas lifi atrofisi ve fibrotik değişimler gözlenir. Dejenerasyon patolojisi ilerleyici yönde seyreder ve 3. ayın sonunda kas lifleri tamamen atrofi geliştirerek yağlı dejenerasyon meydana gelmektedir. Denervasyon sürecinde meydana gelen erken patolojik değişimlerin analiz edilmesi için ilk 10 günlük süreç yeterlidir (48).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1 GEREÇ**

##### **3.1.1 Cerrahi Malzemeler**

- Ksilazin (Alfazin 10 mg/kg)
- Ketamin (Ketalar 90 mg/kg)
- Portegü
- Penset
- Hemostatik pens
- Bisturi
- Cerrahi makas
- Steril iğneli 3/0 katgüt atravmatik emilebilir dikiş malzemesi

##### **3.1.2 Akut Kas Hasar Modeli**

- Kardiyotoksin (Sigma C5759) 5 mg

##### **3.1.3 Akut ve Kronik Hasar Sürecinde Hücre Aktivasyon Analizi**

- *Bromodeoxyuridine* (BrDU Sigma B5002)

##### **3.1.4 Doku Bloklama**

- Tahta Blok
- Doku dondurma ortamı (OCT/JUNG)
- Sıvı Azot
- *İsopentane* (Sigma 59060)

##### **3.1.5 Histolojik Analiz**

- Hematoksilen-Eozin

##### **3.1.6 İmmunfloresan Boyama**

- PBS (Sigma P4417)
- Tween-20 (Sigma P1379)
- Fetal Bovine Serum (Gibco 10500064)
- Pap pen (Abcam ab2601)
- PDGFRa antikoru (Abcam 65258)
- Kollajen-I antikoru (Abcam 90395)
- CD11b (Abcam ab75476)

- BrdU Antikoru (Abcam 6326)
- Laminin Antikoru (Sigma SAB4200719)
- Sekonder antikolar (Abcam ab150167, ab150117, ab150077)
- Mounting Medium (Abcam ab64230)

### 3.1.7 Tek Çekirdekli Hücre İzolasyonu

- Kollajenaz B (Roche 11088831001)
- Dispaz II (Roche D4693-1G)
- Ficoll (GE 17-1440-02)
- DMEM *High Glucose* (Thermo 11965092)
- CaCl<sub>2</sub> (Sigma C1016-500G)
- Mesh 40-100 um (Corning CLS431750-50EA, CLS431752-50EA)
- Fetal Bovine Serum (Gibco 10500064)
- PBS (Sigma P4417)

### 3.1.8 Yüzey Belirteç Boyaması

- PBS (Sigma P4417)
- Primer İşaretli Antikolar
  - Rat-Anti Mouse PDGFRa-APC (BD 562777)
  - Rat-Anti Mouse Ly6ae (Sca1)-PE (BD 553108)
  - Rat-Anti Mouse CD11b-FITC (BD 561688)
  - Rat-Anti Mouse CD31-FITC (BD558738)
  - Rat-Anti Mouse CD45-FITC (BD561088)
  - APC Rat IgG2a k isotype kontrol (BD553932)
  - PE Rat IgG2a, κ Isotype Control (BD553930)
  - FITC Rat IgG2b, κ Isotype Control (BD553988)
  - FITC Rat IgG2a, κ Isotype Control (BD553929)
- Formaldehit (Sigma F8775)

### 3.1.9 BrdU Boyaması

- FITC BrDU Flow kit (BD 559619)
  - Fluorochrome-conjugated anti-BrdU Antibody

- BD Cytofix/Cytoperm™ Buffer
- BD Perm/Wash™ Buffer (10X)
- BD Cytoperm™ Permeabilization Buffer Plus
- 7-AAD
- BrdU (10 mg/mL)
- DNase-I

### **3.1.10 Stromal Hücre Kültürü**

- Matrigel (Corning 356235)
- DMEM-*High Glucose* (Thermo 11965092)
- Hyclone Fetal Bovine Serum (GE SH30071)
- bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) (Sigma F3685-25ug)
- Penisilin/Streptomisin (Biochrome A2210)

### **3.1.11 Adipojenik Farklılaşma Ortamı**

- DMEM-*High Glucose* (Thermo 11965092)
- Fetal Bovine Serum (Gibco 10500064)
- IBMX (Sigma I5879)
- Deksametazon (Sigma D4902-25MG)
- İnsulin (Sigma I2643-25MG)
- L-Glutamin (Sigma G3126)
- Penisilin/Streptomisin (Biochrome A2210)

### **3.1.12 Miyojenik Farklılaşma Ortamı**

- DMEM-*High Glucose* (Thermo 11965092)
- L-Glutamin (Sigma G3126)
- Penisilin/Streptomisin (Biochrome A2210)
- At serumu (Biochrome S9133)

### **3.1.13 RNA İzolasyonu**

- Fast Prep RNA Pro-green kit (QBiogene)
- Trizol Reagent (Invitrogen 15596-026)
- Kloroform (Sigma C7559)



- Dietil pirokarbonat (DEPC, Sigma D5758 )
- Etanol (Riedel)

### **3.1.14 cDNA Kütüphanesi Oluşturma**

- Lexogen QuantSeq 3' mRNA seq Library Prep Kit

### **3.1.15 Yüksek Ölçekli RNA-Dizileme**

- QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit (Lexogen)
- QuantSeq purification modüle (Lexogen)
- Qubit florometrik ölçüm cihazı
- Manyetik Plaka (96'lık)
- Ion PI™ Template OT2 200 Kit v3
- Ion One Touch 2 cihazı
- Ion One Touch ES cihazı
- Picogreen kit
- NaOH (sodyum hidroksit) (Sigma)
- Etanol
- Kloroform
- Agencourt® AMPure® XP Kit Beckman Coulter A63880
- Dynabeads M-270 Streptavidin (Invitrogen 653-05)
- Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3
- Ion PI Chip v3
- Ion Proton semikondüktör yeni nesil dizileme cihazı
- Torrent Server

## 3.2 YÖNTEMLER

### 3.2.1 Akut Kas Dejenerasyon Modelinin Oluşturulması

Akut kas dejenerasyon modelinin oluşturulması için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından 10 adet 10 haftalık erkek swiss fare temin edilmiştir. Her bir hayvanın ayrı ayrı ağırlığı tartılarak ksilazin/ketamin dozları hesaplanmıştır. İntraperitoneal ksilazin/ketamin karışımı enjeksiyonu ile hayvanlar anestezi altına alınmıştır. Anestezi altında bulunan hayvanın sağ bacağı traşlandıktan sonra cilt kesilerek, tibialis anterior kası açığa çıkarılmıştır. 10 uM'lık kardiyotoksin çözeltisi, insülin enjektörü yardımıyla kasa paralel olacak şekilde enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyon sonrası kardiyotoksin etkisine bağlı kas dokusunda şişme ve istemsiz fasikülasyonların olduğu gözlenmiştir (Bu aşama enjekte edilen ajanın kas dokusunda istenilen etkiyi yarattığını göstermektedir.). Kesi yapılan cilt 3/0 katgüt cerrahi ip ile kapatıldı. Hayvanların vital bulguları kontrol edildikten sonra temiz kafeslere aktararak ayımları sağlanmıştır. İşlemi takip eden süreçte ve ardışık günlerde intraperitoneal BrdU (*Bromodeoxyuridine*) enjeksiyonu (1mg/20 gr fare) gerçekleştirilmiştir.

Akut kas hasarının 3. günü (stromal hücre aktivasyonunun maksimum olduğu gün) anestezi altına alınan hayvanların sağ bacak tibialis anterior kasları çıkarılarak, buzda bekletilen PBS tamponu içine alınmıştır. Her bir hayvanın sol bacak kasları ise kontrol kas dokusu olarak toplanmıştır. Dokuların bir kısmı histolojik analiz çalışmaları için bloklanmıştır. Doku toplama işleminin bitmesini takiben hayvanlara yapılan yüksek doz anestezi ile ötenazi işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplanan dokular buz içinde bulunan PBS içinde ilgileri diğer işlemlerin yapılması üzere laboratuvara taşınmıştır.

### 3.2.2 Kronik Kas Dejenerasyon Modelinin Oluşturulması

Kronik kas dejenerasyonu için iki farklı yöntem uygulanmıştır. Bu modellerden biri tendon kesisi diğeri ise siyatik sinir kesisidir. Her iki yöntem için aşağıda belirtilen protokol ortak olarak uygulanmıştır. Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından 10 adet tenotomi modeli için 10 adet denervasyon modeli olmak üzere toplamda 20 adet 10 haftalık erkek swiss fare temin edilmiştir. Her bir hayvanın

ayrı ayrı ağırlığı tartılarak ksilazin/ketamin dozları hesaplanmıştır. İntraperitonel ksilazin/ketamin karışımı enjeksiyonu ile hayvanlar anestezi altına alınmıştır.

### **3.2.2.1 Tenotomi Modelinin Oluşturulması**

Tendon kesisi uygulanacak olan hayvanların sağ bacakları tıraşlandıktan sonra tibialis anterior tenotomisi için, bistüri yardımıyla cilt kesilerek anterior tibial tendona ulaşılmıştır. İlgili tendon potegü ile sıkıştırıldıktan sonra portegünün her iki ucundan kesilmiştir (Amaç aradan parça çıkararak kesi yapmak, olası rejenerasyonu engellemek). Tendon kesisi sırasında tendonun bağlı olduğu kas dokusuna zarar verilmemesine özen gösterilmiştir. Tendon kesisini takiben tibialis anterior kasının dize doğru çekildiği gözlenmiştir. Modelin oluşturulmasını takiben kesi yapılan cilt 3/0 katgüt cerrahi ip ile kapatıldı. Hayvanların vital bulguları kontrol edildikten sonra temiz kafeslere aktararak ayılmaları sağlandı. İşlemi takip eden süreçte ve ardışık günlerde intraperitonel BrdU enjeksiyonu (1mg/20 gr fare) gerçekleştirilmiştir.

Tendon kesisinden sonra 7. gün doku toplama işlemine geçilmiştir. Anestezi altına alınan hayvanların sağ bacak tibialis anterior kasları çıkarılarak, buzda bekletilen PBS tamponu içine alınmıştır. Her bir hayvanın sol bacak kasları ise kontrol kas dokusu olarak toplanmıştır. Dokuların bir kısmı histolojik analiz çalışmaları için bloklanmıştır Doku toplama işleminin bitmesini takiben hayvanlara yapılan yüksek doz anestezi ile ötenazi işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplanan dokular buz içinde bulunan PBS içinde ilgileri diğer işlemlerin yapılması üzere laboratuvara taşınmıştır.

### **3.2.2.2 Denervasyon Modelinin Oluşturulması**

Siyatik sinir kesisi uygulanacak olan hayvanların sağ bacaklarının arka kısmı tıraşlandıktan sonra siyatik sinirin açığa çıkarılması için, bistüri yardımıyla cilt kesilerek siyatik sinire ulaşılmıştır. Siyatik sinir potegü ile sıkıştırıldıktan sonra portegünün her iki uç noktasından, aradan bütün bir parça çıkarılacak şekilde kesilmiştir (Amaç aradan parça çıkararak kesi yapmak, olası rejenerasyonu engellemek). Kesi sonrası bacak postürünün bozulduğu ve serbestleştiği gözlenmiştir. Modelin oluşturulmasını takiben kesi yapılan cilt 3/0 katgüt cerrahi ip ile kapatıldı. Hayvanların vital bulguları kontrol edildikten sonra temiz kafeslere aktararak

aylımaları sağlandı. İşlemi takip eden süreçte ve ardışık günlerde intraperitonel BrdU enjeksiyonu (1mg/20 gr fare) gerçekleştirilmiştir.

Denervasyon modelinden sonra 10. gün doku toplama işlemine geçilmiştir. Anestezi altına alınan hayvanların sağ bacak kasları çıkarılarak, buzda bekletilen PBS tamponu içine alınmıştır. Her bir hayvanın sol bacak kasları ise kontrol kas dokusu olarak toplanmıştır. Dokuların bir kısmı histolojik analiz çalışmaları için bloklanmıştır. Doku toplama işleminin bitmesini takiben hayvanlara yapılan yüksek doz anestezi ile ötenazi işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplanan dokular buz içinde bulunan PBS içinde ilgileri diğer işlemlerin yapılması üzere laboratuvara taşınmıştır.

\*Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulundan 2014/57, 2009/30 dosya numarası ile etik kurul izni alınmıştır.

### 3.2.3 Dokudan Mononükleer Hücre İzolasyonu

- Her üç deney sistemi sonucunda toplanan kas dokuları PBS tamponu döküldükten sonra steril petriye alınarak bistüri yardımı ile mekanik olarak parçalandı.
- Parçalanmış kas dokuları ayrı ayrı falcon tüplere alınarak tartıldı.
- Her 1 gr kas başına DMEM+ 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> içinde hazırlanan %1'lik kollajenaz B ve Dispaz II 2'şer ml olacak şekilde parçalanmış kas dokusuna eklendi.
- Parçalanmış dokusunun akışkan olması için 1 ug DNase-I eklendi.
- 15 dk 37<sup>0</sup>C'de çalkalanarak inkübe edildi.
- İnkübasyon süresinin sonunda 3 dk 700 rpm 4<sup>0</sup>C'de santrifüj edilerek, parçalanmayan kas dokusunun çökmesi sağlandı.
- Üstfaz toplanarak 100 mikron por çapındaki süzgeçten geçirildi.
- Süzgeçten geçirilen enzim+hücre karışımı 5 dk 2000 rpm 4<sup>0</sup>C'de santrifüj edilerek dokudan ayrılmış olan mononükleer hücrelerin çökmesi sağlandı.
- Elde edilen üst faz parçalanmayan doku pelletinin üzerine eklenerek 15 dk 37<sup>0</sup>C'de çalkalanarak inkübe edildi.
- Hücre pelletinin üzerine %2 FCS (*Fetal Calf Serum*) içeren PBS tamponu eklenerek buza alındı.

- Yukarıda anlatılan aşama kas dokusu tamamen parçalanıncaya kadar devam ettirildi.
- Kas dokusu tamamen parçalandıktan sonra elde edilen hücre süspansiyonları 40 mikron por çapındaki süzgeçten geçirildi.
- Her bir örneğin hacmi PBS ile 10 ml'ye getirildikten sonra oda sıcaklığına getirilmiş 10 ml ficoll üzerine yayıldı.
- 400 xg'de swing out rotorda 20 dk santrifüjlendi.
- Ara faz (Buffy coat) toplandı.
- Her örnek için hacim PBS ile 40 ml'ye çıkarılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- Yıkama sonrası elde edilen hücre pelletine 10 ml kültür ortamı eklenerek hücreler steril petriye aktarıldı.
- CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 100 rpmde gece boyu çalkalamaya bırakıldı (yaklaşık 8 saat)
- İnkübasyon süresinin sonunda petrilere toplanan hücreler 1500 rpm 5 dk santrifüjlenerek hücre pelletleri elde edildi.
- Hemasitometre lamı aracılığı ile sayımı yapılan hücreler flow analizi için boyanmak üzere hazır hale getirildi.

### **3.2.4 Hücre Yüzey Belirteç İşaretlemesi**

- Kontrol grubu ve hasar modelleri her bir tüp başına en az 100.000 hücre olacak şekilde 100ul'lik hacimlerde paylaştırıldı.
- Herbir deney grubu için antikorlar flow tüplerine aktarıldı.
- 100.000 hücre/100 ul hücre süspansiyonu antikorları konmuş olan tüplere aktarıldı.
- Hafifçe vortekslendi.
- Oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon süresinin sonunda tüplere 500 ul PBS eklenerek, 10 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona devam edildi.
- 300xg'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst faz atıldı.
- Hücre peletleri üzerine 2 ml PBS eklenerek yıkama işlemine devam edildi.
- 300xg'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst faz atıldı.
- Hücre peleti üzerine 200 ul PBS eklendi.

- Okumanın hemen yapılması durumunda tüpler PBS içinde +4 °C'de muhafaza edildi. Okuma süresinin uzaması durumunda hücre süspansiyonuna formaldehit eklenerek hücreler fikse edilerek +4 °C'de muhafaza edildi.

### 3.2.5 Akut ve Kronik Hasar Sürecinde Aktive Olan Hücre Populasyonlarının

#### Saptanması Amacı ile BrdU boyaması

- BD BrdU Flow kit kullanılmıştır. Kit uygulama prosedürü aşağıda özetlenmiştir.
- BrdU boyaması öncesi 3.2.4'te özetlenen protokol ile öncelikle ilgili yüzey boyaması tamamlandıktan sonra BrdU boyama aşamasına geçilmektedir.
- Yüzey belirteç işaretlemesi tamamlanan örneklerin üzerine 100 ul *Cytofix/Cytoperm* tamponu eklendi.
- 30 dk buz üzerinde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tüplere 1'er ml 1x BD Perm/Wash tamponu eklendi.
- 5 dk 300xg'de santrifüj edildi. Üst faz atıldı.
- Hücre pelleti üzerine 100 ul BD *Cytoperm* Permeabilizasyon tamponu eklendi.
- 10 dk buz üzerinde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tüplere 1'er ml 1x BD *Perm/Wash* tamponu eklendi.
- 5 dk 300xg'de santrifüj edildi. Üst faz atıldı.
- Hücre pelleti üzerine 100 ul *Cytofix/Cytoperm* tamponu eklendi.
- 5 dk buz üzerinde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tüplere 1'er ml 1x BD Perm/Wash tamponu eklendi.
- 5 dk 300xg'de santrifüj edildi. Üst faz atıldı.
- Hücre pelleti üzerine 30ug DNase-I/100 ul eklendi.
- 1 saat 37°C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tüplere 1'er ml 1x BD *Perm/Wash* tamponu eklendi.
- 5 dk 300xg'de santrifüj edildi. Üst faz atıldı.
- Hücre pelleti 1x BD *Perm/Wash* tamponu ile 50 ul hacme getirildi. Üzerine 1 ul anti-BrdU-FITC antikoru eklendi (1:50 dilüsyon)
- 20dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tüplere 1'er ml 1x BD Perm/Wash tamponu eklendi.
- 5 dk 300xg'de santrifüj edildi. Üst faz atıldı.

- Hücre pelleti 200 ul PBS ile suspende edilerek okumaya hazır hale getirildi.

### 3.2.6 Stromal Hücre Kültürü

- Stromal hücre yüzey belirteçlerine göre flowsitometri ile izole edilen hücreler. Matrigel kaplı kültür plakalarına aşağıda içeriği detaylı olarak verilen besi yeri içinde %5 CO<sub>2</sub> 37<sup>0</sup>C'de kültüre edildi.
- cm<sup>2</sup>'ye 10.000 hücre olacak şekilde 12 kuyu kültür plakasına ekim yapıldı.

**Tablo 3.1:** Stromal hücre kültür ortamı

DMEM-Yüksek Glukoz	38.5 ml
Hyclone FBS	10 ml (%20)
Penisilin/Streptomisin	0.5 ml (%1)
Amfoterisin B	0.5 ml (%1)
L-Glutamin	0.5 ml (1)
bFGF	1 ul (5 ng/ml)
Toplam	50 ml

### 3.2.7 Adipojenik Farklılaşma Ortamı

- Kültüre edilen stromal hücrelerin fibro-adipojenik projenitör olup olmadığının karakterize edilmesinde adipojenik ve miyojenik farklılaşma ortamları uygulanmaktadır.
- Stromal kültür ortamında çoğaltılan hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra besi ortamı aşağıda detayları verilen adipojenik farklılaşma ortamı ile değiştirilerek kültüre edilmiştir.
- 14-21 gün boyunca kültür devam ettirilerek yağ damlacığı oluşumu ve oluşan damlacıkların olgunlaşma sürecine kadar kültür sürdürülmüştür.

**Tablo 3.2:** Adipojenik farklılaşma besi ortamı

DMEM-Yüksek Glukoz	Hacim 50 ml'ye tamamlanır
FBS	%10
Penisilin/Streptomisin	%1

**Tablo 3.2:** (Devam)Adipojenik farklılaşma besi ortamı

Amfoterisin B	%1
L-Glutamin	%1
IBMX	0.5 mM
Deksametazon	0.25 uM
İnsulin	10 ug/ml
Toplam	50 ml

### 3.2.8 Miyojenik Farklılaşma Ortamı

- Stromal kültür ortamında çoğaltılan hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra besi ortamı aşağıda detayları verilen miyojenik farklılaşma ortamı ile değiştirilerek kültüre edilmiştir.
- 7-14 gün boyunca kültür devam ettirilerek miyojenik öncüllere dönüşen hücrelerin kas lifi oluşturup, oluşturmadıkları araştırılmıştır.

**Tablo 3.3:** Miyojenik farklılaşma besi ortamı

DMEM-Yüksek Glukoz	Hacim 50 ml'ye tamamlanır
At serumu	%2
Penisilin/Streptomisin	%1
Amfoterisin B	%1
L-Glutamin	%1
Toplam	50 ml

### 3.2.9 RNA izolasyonu

Flow sitometre ile izole edilen stromal hücre popülasyonları doğrudan *Trizol* içine alınarak, izolasyon sürecine kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. RNA izolasyonu kapsamında aşağıda detayları verilen protokol uygulanmıştır.

- $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılan örnekler eriyene kadar buz üzerinde bekletildi.
- Üzerine 200  $\mu\text{l}$  kloroform eklendi ve karıştırıldı.
- $4^{\circ}\text{C}$ 'de 12000 g'de 15 dk santrifüj edildi.
- Üst faz steril 1.5ml'lik tüplere aktarıldı.



- Yeni tüpe aktarılan faza, 750 µl, %100'lük etanol eklendi ve karıştırıldı.
- -20°C'de 30 dk bekletildi.
- 4°C' de 12000 g'de 10 dk santrifüj edildi.
- Üst faz atıldı.
- Pellet üzerine 750 µl, %75'lik etanol ve final konsantrasyonu örnek başına 15 ug (5 ug/ul stok) olacak şekilde Lineer Poliakrilamid eklendi.
- 4°C' de 7500 g'de 5dk santrifüj edildi.
- Üst faz atıldı.
- Kalan etanolün uçması için, Pellet, 60°C'de inkübe edildi ve üzerine öncede
- DEPC ile muamele edilmiş sudan eklenerek RNA'nın çözülmesi sağlandı.
- İzole edilen RNA'lar -80°C'de saklandı.

### **3.2.10 İmmunfloresan Boyama**

- -80°C'den çıkarılan doku preparatları 1x PBS içinde oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 1 x PBS içinde hazırlanmış %4 PFA buz içinde bulunan şaleye aktarıldı.
- PBS içinde bekleyen preparatlar, PFA içine alınarak buzda 30 dk fikse edildi.
- Fiksasyon sonrası örnekler 1x PBS ile 3 kez yıkandı.
- BrdU boyaması yapılacak örnekler için bu aşamadan sonra *antigen-retrival* aşamasına geçildi. Her bir kesit üzerine 10mM sodyum sitrat eklendi. Buharda 30 dk bekletildi.
- 10 dk oda sıcaklığında soğuması için bekletildi.
- Kesitlerin üzerine bloklama solüsyonu (%5FBS+ %0.1 Tritonx-100 PBS) eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
- Bloklama aşamasından sonra, bloklama solüsyonu içinde hazırlanan primer antikolar kesitlerin üzerine uygulandı.
- Gece boyunca 4°C' de inkübe edildi.
- %0.1 Tritonx-100 PBS ile 3 kez yıkandı.
- Bloklama solüsyonu içinde hazırlanan sekonder antikolar kesitlerin üzerine uygulandı.
- Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

- %0.1 Tritonx-100 PBS ile 3 kez yıkandı.
- Mounting medium ile preparatlar kapatılarak, görüntüleme sürecine kadar ışık almayacak şekilde 4°C' de saklandı.

### **3.2.11 Yüksek Ölçekli RNA Dizileme Çalışması**

#### **a. İlk Zincir cDNA sentezi**

OligodT primer içeren Ion Torrent-uyumlu oligo dizileri mRNA'ların Poly-A dizilerine hibridize edildi ve ters (*reverse*) transkripsiyon gerçekleştirildi. Bu işlem için ilk olarak yaklaşık 20-100 ng total RNA örnekleri 5 µl First Strand cDNA Synthesis Mix 1 (FS1) karıştırıldı. RNA/FS1 karışımı 85 °C'de 3 dakikada denatüre edildi ve 42°C'ye soğutuldu. Daha sonra her bir örnek için test tüpüne 9.5 µl First Strand cDNA Synthesis Mix 2 (FS2) ve 0.5 µl Enzyme Mix 1 (E1) içeren reaksiyon karışımı eklendi ve karıştırıldı. 42°C'de 15 dakika inübasyon yapıldı.

#### **b. RNA Uzaklaştırması**

Bu aşamada ikinci zincir sentezine hazırlık olması için RNA kalıpları degrade edildi. Her bir örneğe 5 µl RNA Removal Solution 1 (RS1) eklendi ve 10 dakika 95 °C'de inkübasyon yapıldı. 25 °C'ye soğutulan örneklerle 5 µl of RNA Removal Solution 2 (RS2) eklendi ve karıştırıldı.

#### **c. İkinci Zincir Sentezi**

RNA kütüphaneleri bu aşamada çift zincirli DNA haline getirildi. İkinci zincir sentezi için random diziler ve Ion-Torrent uyumlu bağlayıcı dizi içeren primerler ile hibridizasyon yapıldı. Bu aşamada her bir örneğe ayrı bir barkod dizisi eklenerek, örneklerin aynı yeni nesil dizileme koşumunda sekanslanmasına olanak sağlandı. Örneklerin her birine ayrı bir barkod dizi karışımı 15'er µl olacak şekilde eklendi ve 98 °C'de 1 dakika inkübasyonun ardından 25 °C'ye soğutuldu. Bu karışım 30 dakika 25 °C'de bekletildi. Ardından 4 µl Second Strand Synthesis Mix (SS) ve 1 µl Enzyme Mix 2 içeren karışımlar her bir örneğe eklendi ve karıştırıldı. 25 °C'de 15 dakika süren reaksiyonun ardından saflaştırma aşamasına geçildi.

**d. Çift Zincirli Kütüphanelerin Saflaştırılması**

Çift zincirli hale gelen kütüphaneler Lexogen firmasının manyetik küreler ile saflaştırıldı. Her bir örnek 20 µl saflaştırma bead'leri (PB) ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Manyetik plaka (*plate*) ile yapılan ayrıştırma sayesinde süpernatant kısmı ile kütüphanelerin bağlandığı beadler birbirinden ayrıldı ve süpernatant atıldı (2-5 dakikalık inkübasyon). 40 µl Elution Tamponu (Buffer) (EB) eklendi ve resüspansiyonun ardından oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyon yapıldı. Her bir örneğe 56 µl Purification Solution (PS) eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bu aşamanın ardından örnekler manyetik plakaya koyuldu ve süpernatant ayrışana kadar beklendi (yaklaşık 5 dakika). Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra her bir örnek 30 saniye boyunca 120 µl %80'lik etanol ile arka arkaya 2 kez yıkandı. Etanol damlacıklarının kuruması için örnekler manyetik plaka üzerinde 5-10 dakika bekletildi. Her bir örneğe 20 µl of Elution Tamponu (Buffer) (EB) eklendi ve resüspansiyonun ardından oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyon yapıldı. Manyetik plaka üzerine alınan örnekler 2-5 dakika inkübe edildikten sonra, manyetik bead'lere dokunmadan süpernatant kısmından 17'şer µl alındı ve yeni tüplere aktarıldı.

**e. Kütüphane Amplifikasyonu**

Saflaştırılmış kütüphanelerin her biri için 12 µl PCR Mix (PCR) ve 1 µl Enzyme Mix 3 (E3) içeren karışımlar hazırlandı ve örneklerin üzerine eklendi. Aşağıdaki protokol ile amplifikasyon gerçekleştirildi:

98°C, 30 saniye

**98°C, 10 saniye**

**65°C, 20 saniye (17 döngü)**

**72°C, 30 saniye**

72°C, 1 dakika

**f. Amplifiye Edilen Kütüphanelerin Saflaştırılması**

Her bir örneğin üzerine 36 µl Purification Beads (PB) eklenip karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon yapıldı. Örnekler manyetik plakaya koyuldu ve süpernatant ayrışana kadar beklendi (2-5 dakika). Süpernatant atıldıktan sonra 30 µl Elution Tamponu (Buffer) (EB) eklendi ve resüspansiyonun ardından oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyon yapıldı. Her bir örneğe 36 µl Purification Solution (PS) eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bu aşamanın ardından örnekler manyetik plakaya koyuldu ve süpernatant ayrışana kadar beklendi (yaklaşık 5 dakika). Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra her bir örnek 30 saniye boyunca 120 µl %80'lik etanol ile arka arkaya 2 kez yıkandı. Etanol damlacıklarının kuruması için örnekler manyetik plaka üzerinde 5-10 dakika bekletildi. Her bir örneğe 20 µl of Elution Tamponu (Buffer) (EB) eklendi ve resüspansiyonun ardından oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyon yapıldı. Manyetik plaka üzerine alınan örnekler 2-5 dakika inkübe edildikten sonra, manyetik bead'lere dokunmadan süpernatant kısmından 15'er µl alındı ve yeni tüplere aktarıldı. Bu sayede saflaştırılmış kütüphaneler elde edilmiş oldu.

**g. Kütüphanelerin Ölçümü**

Kütüphanelerin kantitatif miktar tayini Qubit cihazı ve PicoGreen kullanılarak kullanılarak florometrik yöntem ile yapıldı. Qubit dsDNA High Sensitive Quantitation kit içerisindeki standartlar yardımı ile çift zincirli DNA moleküllerinin miktarı saptandı.

**h. Emülsiyon PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

Her bir kütüphanenin 100 pM'lık ara stok solüsyonundan 2'şer µl alınarak nükleaz içermeyen 92 µl su içerisinde birleştirildi. Emülsiyon PZR karışımını oluşturmak için Ion PI Hi-Q OT2 200 kiti içerisinde yer alan Ion Sphere Particles isimli nanokürelerden 100 µl, Ion PI Enzyme Mix'ten 120 µl, birleştirilmiş kütüphaneler (100 µl) ve 80 µl nükleaz içermeyen su Ion PI reaction mix (yaklaşık 2 ml'lik tek tüp) içerisinde karıştırıldı. Bu karışım Ion One Touch Reaction Filter'a yüklendi ve üzerine 200 µl Ion One Touch Reaction Oil eklenerek Ion One Touch 2 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) cihazına yerleştirildi. Kullanılan kit ile uyumlu olan program

seçildi ve yaklaşık 5 saat süren emülsiyon reaksiyonu gerçekleştirilerek kütüphanelerde yer alan her bir DNA fragmanının klonal olarak amplifikasyonu sağlandı. Reaksiyon sonrası kalıp DNA içeren Ion PI ISP'leri saflaştırmak için son bir santrifüj basamağından sonra tüpün tabanına yapışmış Ion PI ISP'ler süpernatant atılarak düşük nükleik asit bağlama yeteneğindeki 1.5 ml hacmindeki tüplere alındı. Nükleaz içermeyen su eklenerek yıkanan kalıp DNA içeren Ion PI ISP'ler, ISP Resuspension Solution içerisinde çözüldü ve zenginleştirme basamağına geçildi. Zenginleştirme aşamasında DynaBeads MyOne Streptavidin C1 Beads (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ve Ion One Touch ES kullanıldı. Otomatize pipetaj ve manyetik ayrıştırıcı içeren Ion One Touch ES cihazına, NaOH-tween karışı ile hazırlanan Melt-Off Solüsyonu (300 µl), Ion One Touch ES Wash Solution (300 µl'lik 3 ayrı tüp), Ion PI ISP'ler (100 µl) ve DynaBeads MyOne Streptavidin C1 Beads (130 µl) içeren 8'li şerit tüpler yerleştirildi ve yaklaşık 40 dk süren seri yıkamalar ile kütüphanelerin bağlı olduğu nanoküreler yüksek ölçekli dizilemeye hazır hale geldi.

### **i. Semikondüktör Dizileme**

Bu aşamada Ion PI Hi-Q Sequencing 200 Kit, Ion PI Chip v3 ve Ion Proton Yeni Nesil Dizileme Cihazı (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) kullanılarak yüksek ölçekli dizi analizi gerçekleştirildi. İlk olarak, Ion PI Control ISP'ler zenginleştirilmiş Ion PI ISP'ler ile karıştırılıp santrifüj edildikten sonra, çökelti üzerine Ion PI Annealing Buffer (15 µl) ve Ion PI Sequencing Primer (20 µl) eklendi ve hazırlanan karışım 95°C'de 2 dakika, ardından 37°C'de 2 dakika inkübe edildi. 10 µl Ion PI Loading Buffer eklenen solüsyon Ion PI Chip v3 çipi yükleme kuyusuna koyuldu ve Ion Chip Minifuge (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) cihazı ile 10 dakika santrifüj edilerek nanokürelerin çip kuyularına yerleşmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra 2 kez Foaming Solüsyonu (100 µl) ve Annealing tamponu (55 µl) uygulanan ve 30 saniye santrifüj edilen çip 2 kez Flushing Solüsyonu (100 µl) ve 3 kez Annealing tamponu (100 µl) uygulanarak yıkandı. Son olarak çipe Annealing tamponu (50 µl) ile karıştırılmış Ion PI Hi-Q Sequencing Polymerase (6 µl) yüklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Bu aşamadan sonra çip önceden temizlenmiş ve başlatılmış Ion Proton Yeni Nesil Dizileme Cihazına yüklenilerek dizileme aşaması gerçekleştirildi. Yaklaşık 2 saat süren

dizileme reaksiyonu sonrasında UBAM dosyaları Ion Proton cihazına bağlı olarak veri işlemesi sağlayan Torrent Server üzerinden elde edildi.

### **3.2.12 Verilerin Değerlendirilmesi ve Analiz**

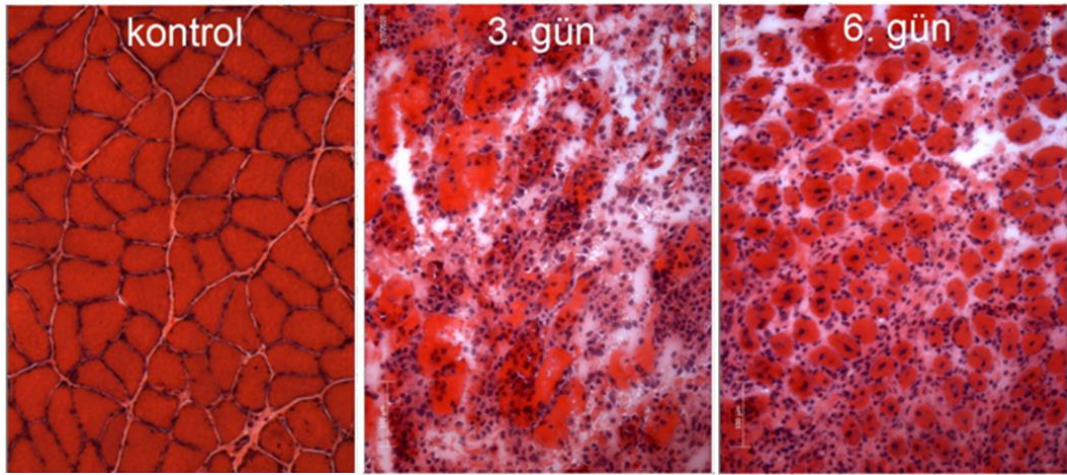
Bam data dosyası halindeki ham veriler (basecaller.BAM veri dosyaları) ilk olarak Cufflinks (Versiyon 2.2.1 <http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>) programı kullanılarak SAM veri formatında okuma fragmanlarına donüştürüldü. SAM okuma fragmanları STAR (RNASTAR Version 2.5- <https://github.com/alexdobin/STAR>) kullanılarak Ensembl Fare referans genom dizisine (Ensembl GRCm38.P5 Release 90) örtüştürüldü. DeSeqR yazılımı ile transkript tanımlama gerçekleştirildi ve tanımlı gen dizilerine (Ensembl gen kodları) karşılık gelen nicel okuma sayıları belirlendi. Okuma sayılarının normalizasyon, filtreleme ve karşılaştırma işlemleri için BRB Array Tools yazılımı kullanıldı (V4.5.1). Log2 skalada elde edilen kat değişimi değerleri Microsoft Excel tabloları ile listelendi. İncelenen transkript verilerinin yolak analizleri ve niteleyici analizler için DAVID (ver.6.8) kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Akut Kas Dejenerasyonunun Oluşturulması ve Hasar Sonrası Tamir Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi

#### 4.1.1. Akut Kas Dejenerasyon Modelinin Oluşturulması

Hasar sonrası tamir sürecinde meydana gelen inflamasyonla eş zamanlı olarak stromal hücre aktivasyonu meydana gelmektedir. Farklı hasar modellerinde stromal hücre aktivasyonunun ne yönde değiştiğinin araştırılması amacı ile akut ve kronik modeller oluşturuldu. Bu amaç doğrultusunda akut model oluşturmada tibialis anterior kasına kardiyotoksin enjekte edildi. Modelin doğrulanması amacı ile hasar sonrası 3. ve 6. günlerinde alınan doku kesitlerinde hematoxilen & eosin boyaması yapılarak hasar sonrası doku morfolojisi incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.1).

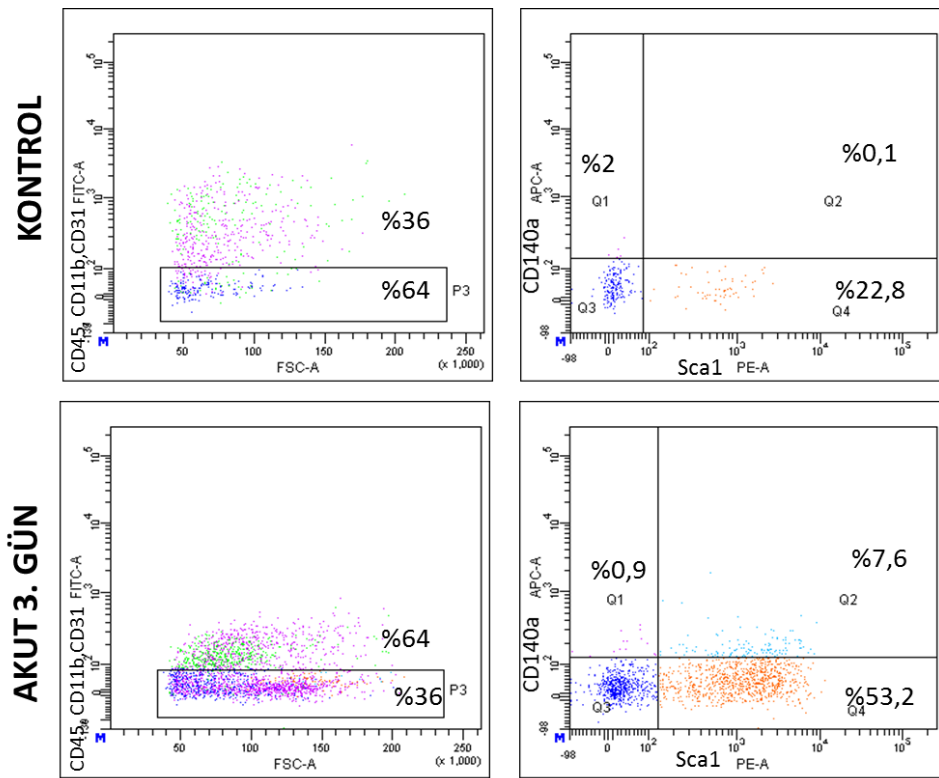


**Şekil 4.1:** Akut hasar sonrası tamir sürecinin 3. ve 6. günleri

Kontrol kas grubu ile karşılaştırıldığında, kardiyotoksin enjeksiyonu sonrası 3. gün örneğinde kas liflerinin yapısal bütünlüğünün bozulduğu ve parçalanmış kas lifleri arasında yoğun olarak tek çekirdekli hücre infiltrasyonunun meydana geldiği gözlenmiştir. Akut hasar sonrası tamir sürecinin 6. gününde ise kontrol kas liflerine göre küçük çapta merkezi çekirdekli rejenere kas lifleri gözlenmektedir. Yeni oluşan kas liflerinin arasında tek çekirdekli hücreler de varlığını sürdürmektedir. Elde edilen bulgular modelin literatürle uyumlu olarak oluşturulduğunu göstermektedir.

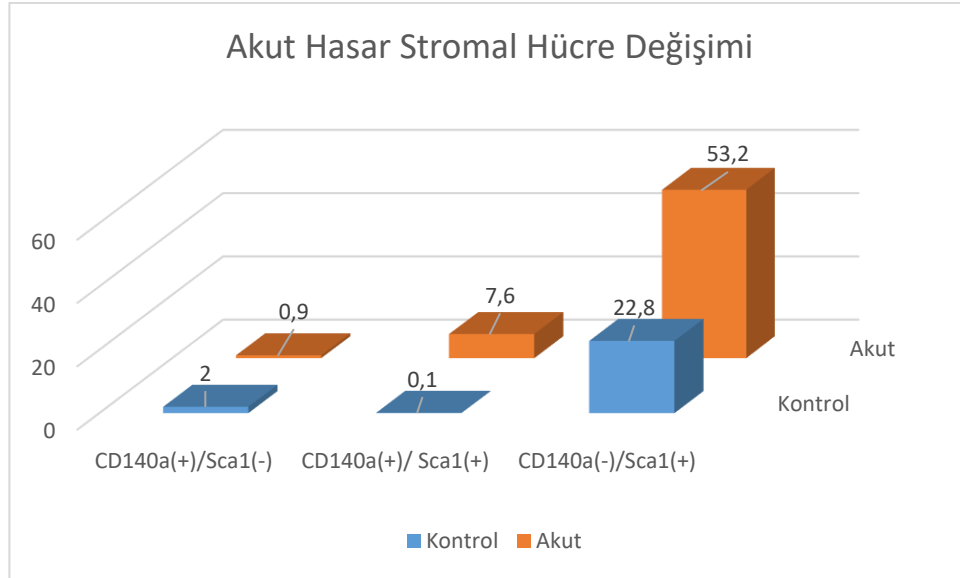
#### 4.1.2 Hasar Sonrası Tamir Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi

Akut hasar sonrası tamir sürecinin 3. günü inflamasyonun ve stromal hücre aktivasyonun maksimum olduğu aşamadır. Bu nedenle hasar gerçekleştirildikten sonra 3. gün kas dokuları toplanarak, kontrol grubu ile birlikte stromal hücre değişimleri incelenmiştir.

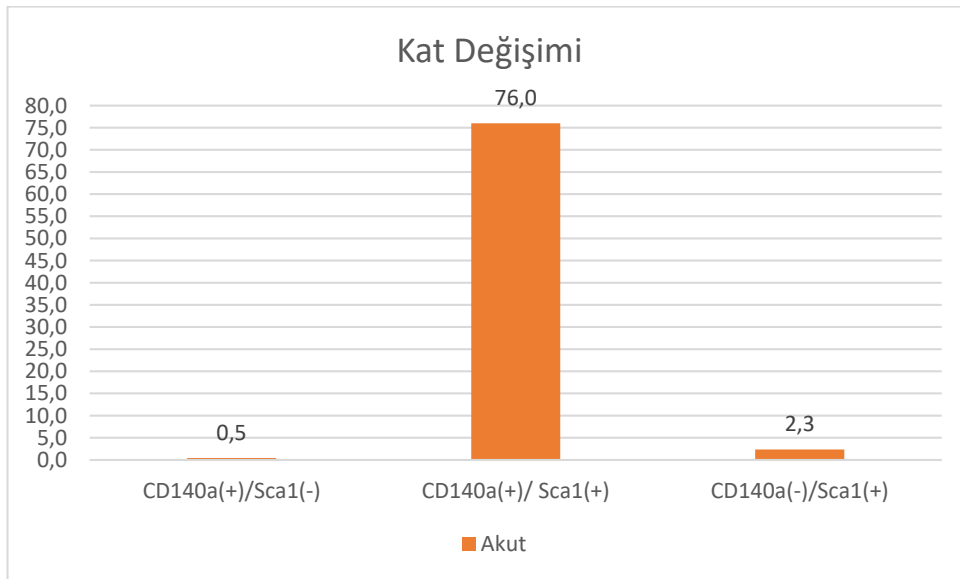


Şekil 4.2: Akut hasar sonrası 3. gün stromal hücre değişim profili

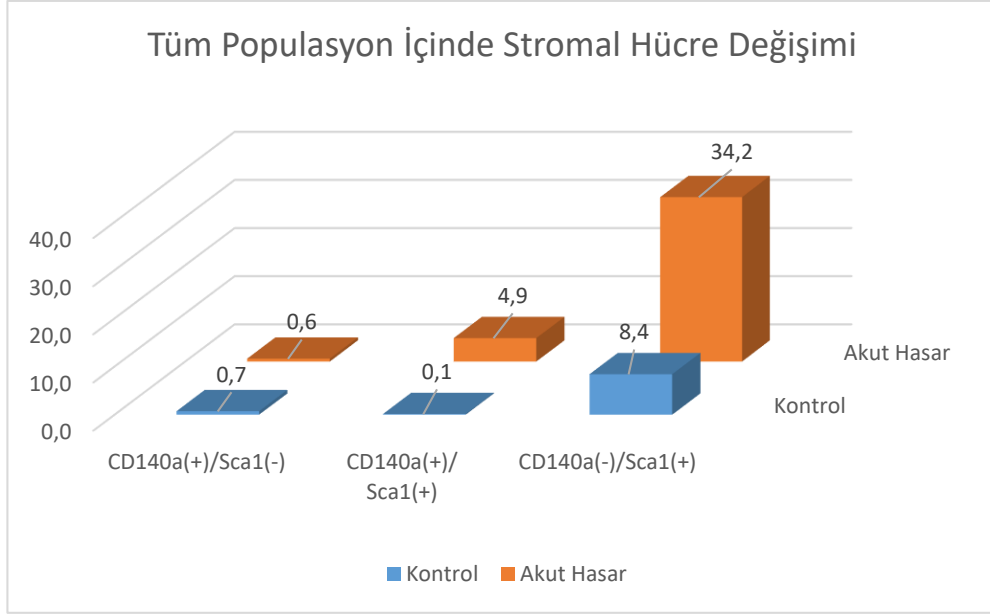




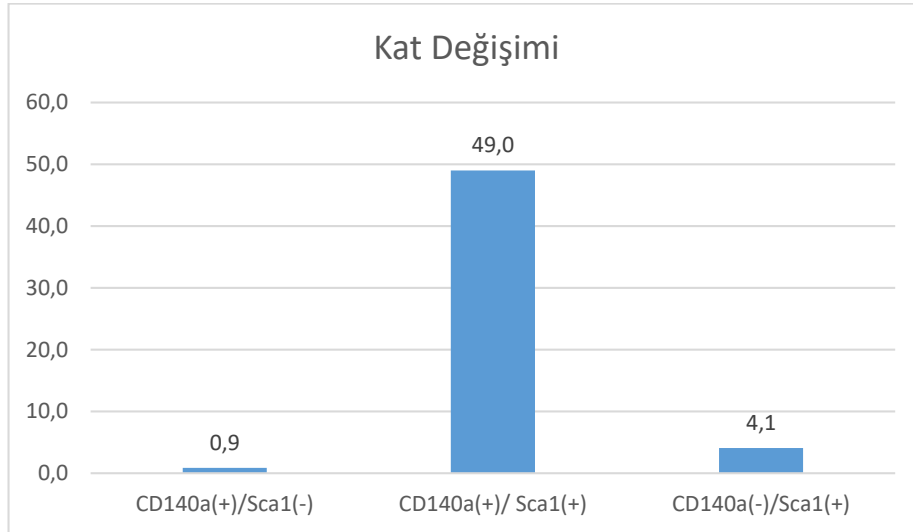
**Şekil 4.3.** CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) populasyon içinde akut hasar sonrası 3. gün stromal hücre değişim profili



**Şekil 4.4.** CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) populasyon içinde akut hasar sonrası 3. gün kontrole göre stromal hücre kat değişimleri



**Şekil 4.5.** Tüm populasyon içinde akut hasar sonrası 3. gün stromal hücre değişim profili

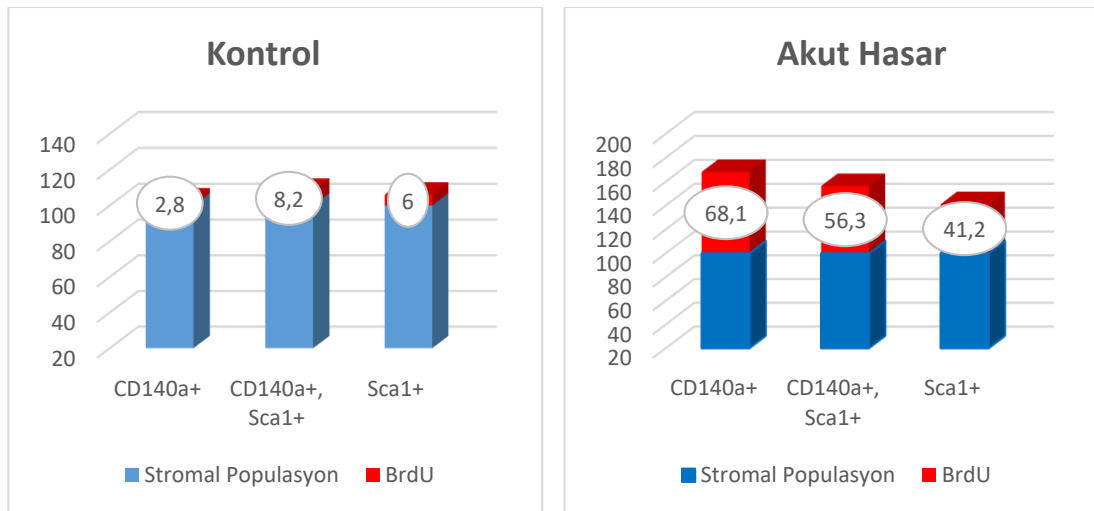


**Şekil 4.6.** Tüm populasyon içinde akut hasar sonrası 3. gün kontrole göre stromal hücre kat değişimleri

Akut hasar sonrası tamir sürecinin 3. gününde gerçekleştirilen analizlerde stromal populasyon değişimleri hem CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) populasyon içinde hem de tüm hücre populasyonu içinde ayrı ayrı hesaplanmıştır. CD45(-)/CD31(-)/CD11b(-) hücre populasyonu içinde CD140a(+)/Sca1(-) hücre grubu kontrolde %2 iken, akut hasar 3. günde %0,9 olarak değişmiştir. CD140a(-)/Sca1(+) populasyon kontrol grubunda %22,8'den akut hasar 3. gün %53,2 olarak artış göstermiştir. CD140a(+)/Sca1(+) hücre populasyonu ise %0,1'den, akut hasar 3. gün %7,6 olarak

dramatik bir artış göstermiştir (Bkz. Şekil: 4.4). Kontrole göre stromal populasyonlar arasındaki kat artışlar hesaplandığında Sca1(-)/CD140a(+): 0,5, CD140a(-)/Sca1(+): 2,3, CD140a(+)/Sca1(+): 76 katlık değişim göstermiştir.

İnflamatuvar ve endotel hücre dışındaki populasyon değişimlerine ek olarak tüm populasyon içinde de stromal hücre değişim oranları hesaplanmıştır. Bu hesaplama göre CD140a(+)/Sca1(-) kontrol grubunda %0,7 'den akut hasar 3. gün %0,6 'lık minimal bir değişim göstermiştir. CD140a(-)/Sca1(+)' hücre populasyonu kontrol grubunda %8,4'ten akut hasar 3. gün %34,2 'ye yükselmiştir. CD140a(+)/Sca1(+)' populasyon değişimi ise kontrol grubunda %0,1'den akut hasar 3. gün %4,9'a yükselmiştir. Bu grupların da kontrole göre kat artışları hesaplandığında CD140a(+)/Sca1(-) populasyonun değişmediği, CD140a(-)/Sca1(+)' populasyonun 4,1 kat artış gösterdiği, CD140a(+)/Sca1(+)' populasyonun ise 49 katlık artış gösterdiği gözlenmiştir. Hem CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-)' populasyon içindeki değişimler hem de toplam hücre grubundaki değişimler birbiri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Akut hasar sürecinde dramatik artış gösteren populasyonun CD140a(+)/Sca1(+)' populasyon olduğu, CD140a(+)/Sca1(-)' belirteci taşıyanların değişmediği, CD140a(-)/Sca1(+)' populasyonların ise tüm dokuda 4 katlık bir değişim gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.7. Akut hasar sürecinde stromal hücre aktivasyon oranı

Stromal hücre populasyonlarının BrdU analizinde, inflamatuvar hücrelerle birlikte tüm hücre populasyonu birlikte incelenmiştir. Kontrole akut hasar 3. gün

toplam CD140a(+)/Sca1(-), CD140a(-)/Sca1(+) ve CD140a(+)/Sca1(+) hücre grupları ayrı ayrı incelendiğinde her üç populasyon grubu için BrdU pozitifliği artış göstermiştir.

#### **Değişim oranları:**

CD140a(+)/Sca1(-): 2,8 → 68,1

CD140a(+)/Sca1(+): 8,2 → 56,3

CD140a(-)/Sca1(+): 6 → 41,2

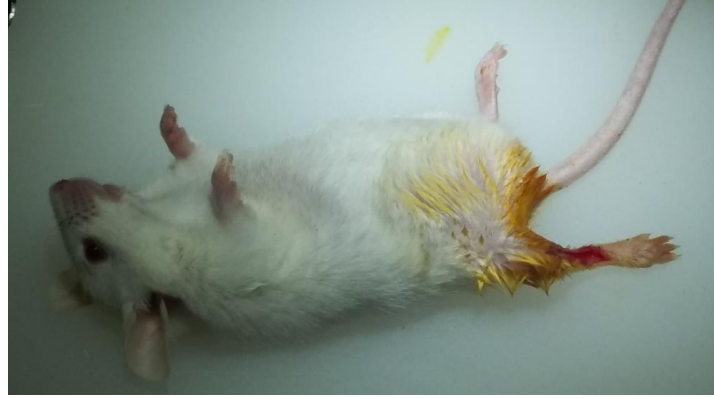
### **4.2. Tenotomi Modelinin Oluşturulması ve Dejenerasyon Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi**

#### **4.2.1 Tenotomi Modelinin Oluşturulması**

Kas dokusunda kronik hasar modelinin gerçekleştirilmesi amacı ile tendon kesisi uygulanmış olup, dejenerasyon sürecinde stromal hücre değişimi profillenmiştir. Tenotomi modelinin oluşturulması amacıyla hedef kas dokusu tibialis anterior seçilmiştir. İlgili kas dokusunda dejenerasyonun gerçekleştirilmesi amacı ile anterior tibial tendonda, dokuya zarar vermeden kesi oluşturulmuştur (Bkz. Şekil 4.8).



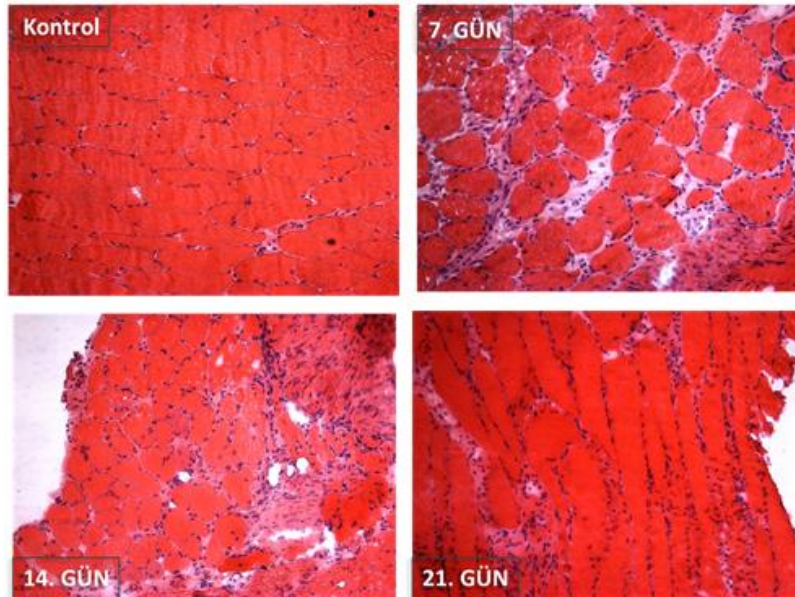
**Şekil 4.8.** Anterior tibial tendon



**Şekil 4.9.** Tendon kesisi sonrası alt ekstremitte postur değişimi



**Şekil 4.10.** İşlem sonrası 7. gün alt ekstremitte postur değişimi devamlılığı

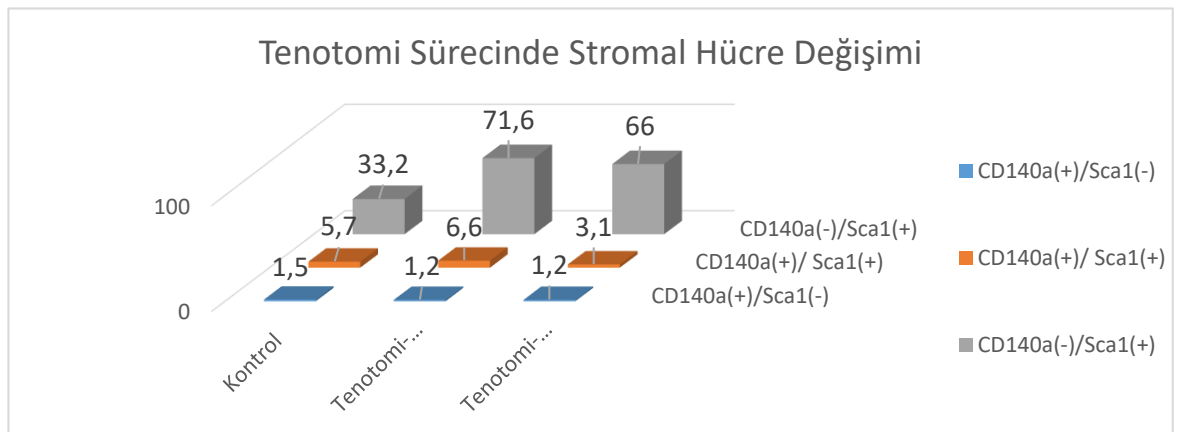
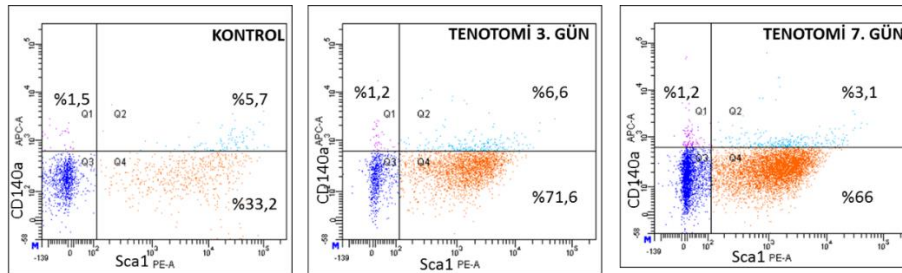


**Şekil 4.11.** Tenotomi sonrası zamana bağlı kas dejenerasyonunun H&E boyaması ile gözlenmesi

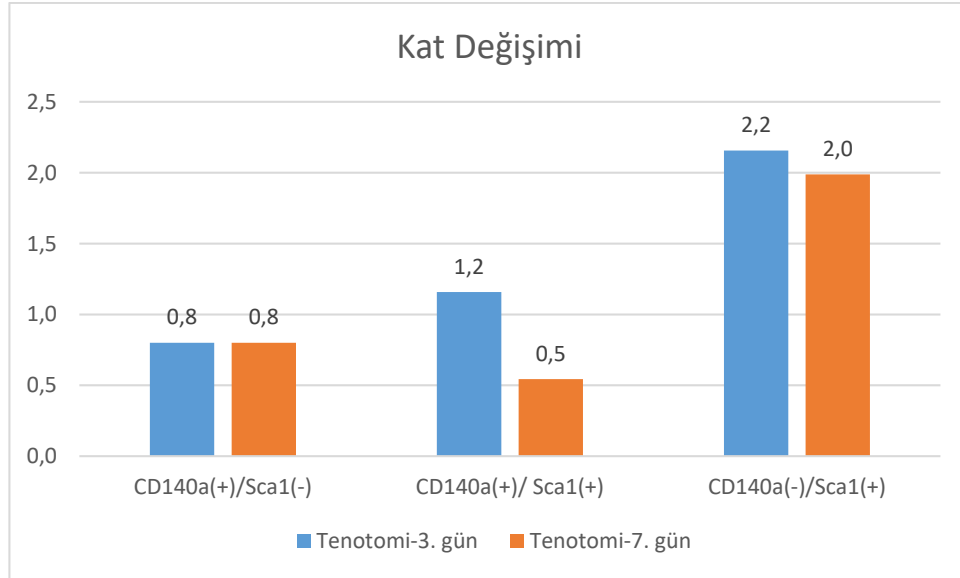
Gerçekleştirilen histolojik analiz sonucunda anterio tibial tendon kesisini takip eden ilk 7 günlük süreçte kas lifi atrofisi ve dejenere kas lifleri arasında artan tek çekirdekli hücre popülasyonu gözlenmiştir. Devam eden 14. gün ve 21. günlerde ilgili dejenerasyon patolojisinin kalıcı olduğu gözlenmiştir.

#### 4.2.2 Tenotomi Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi

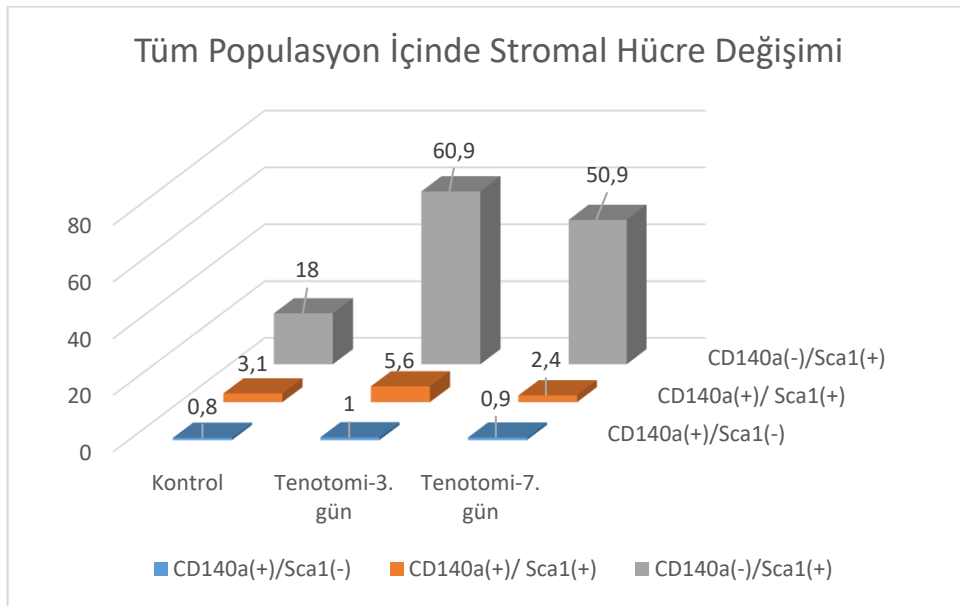
Tibialis anterior tenotomisini takip eden 7 günlük süreçte erken dejenerasyon bulgularının ortaya çıktığı, gerçekleştirilen histolojik incelemeler ile ortaya konmuştur (Bkz. Şekil 4.11). Kronik hasar modellerinde stromal hücrelerin aktive olduğu zaman diliminin incelenmesi hedeflendiği için, dejenerasyonun erken sürecindeki zaman dilimlerinde inceleme gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda anterio tibial tendon kesisini takip eden süreçte stromal hücre populasyon değişiminin profillemesi amacı ile dejenerasyonun 3. ve 7. günlerinde dokular toplanarak, kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.



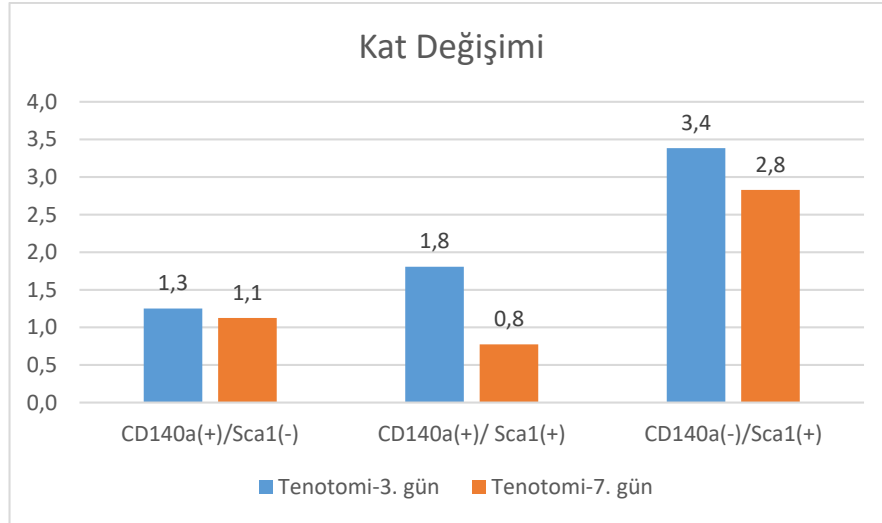
Şekil 4.12. CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) popülasyon içinde tenotomi sonrası 3. ve 7.günler stromal hücre değişim profili



**Şekil 4.13.** CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) populasyon içinde tenotomi sonrası 3. ve 7. günler stromal hücre kat değişimi



**Şekil 4.14.** Tüm hücre populasyonu içinde tenotomi sonrası 3. ve 7.günler stromal hücre değişim profili

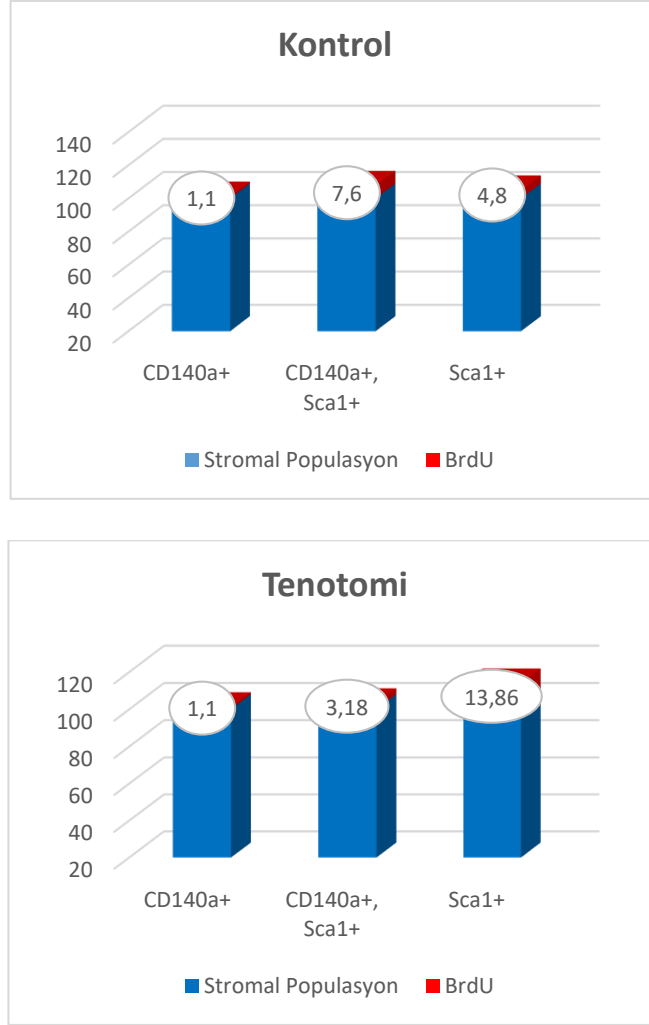


**Şekil 4.15.** Tüm hücre popülasyonu içinde tenotomi sonrası 3. ve 7.günler stromal hücre kat değişimi

Tenotomi sonrası dejenerasyon sürecinde 3. ve 7. günde gerçekleştirilen analizlerde stromal popülasyon değişimleri hem CD45(-)/CD31(-)/CD11b(-) popülasyon içinde hem de tüm hücre popülasyonu içinde ayrı ayrı hesaplanmıştır. CD45(-)/CD31(-)/CD11b(-) hücre popülasyonu içinde CD140a(+)/Sca1(-) hücre grubu kontrolde %1,2 iken tenotomi 3. ve 7. günlerde değişim göstermemiştir. CD140a(+)/Sca1(+) hücre popülasyonu kontrol grubunda %5,7 iken, tenotomi 3. gün %66, 7. gün ise %3,1 olarak değişim göstermiştir. CD140a(-)/Sca1(+) popülasyon değişimi, kontrolde %33,2 oranında bulunurken, tenotomi 3. gün %71,6, 7. gün ise %66 olarak değişim göstermiştir. Hem CD45(-)/CD31(-)/CD11b(-) popülasyon içinde hem de tüm popülasyondaki kat değişimleri incelendiğinde CD140a(+)/Sca1(-) popülasyonunun değişmediği, CD140a(+)/Sca1(+) popülasyonda kontrole göre 3. gün 1,2-1,8 katlık artış, 7. gün ise 0,5-0,8 katlık azalış gösterdiği gözlenmiştir. CD140a(-)/Sca1(+) popülasyonun ise dejenerasyonun 3. ve 7. günlerinde 2-3 katlık artış gösterdiği gözlenmiştir.

Gerçekleştirilen analiz sonucunda tenotomi sürecinde Sca1(-)/CD140a(+), CD140a(+)/Sca1(+) popülasyonlarının artış göstermediği, CD140a(-)/Sca1(+) hücrelerin ise süreçte en yüksek artışı gösteren hücre popülasyonu olduğu gözlenmiştir.





**Şekil 4.16.** Tenotomi sürecinde stromal hücre aktivasyon oranı

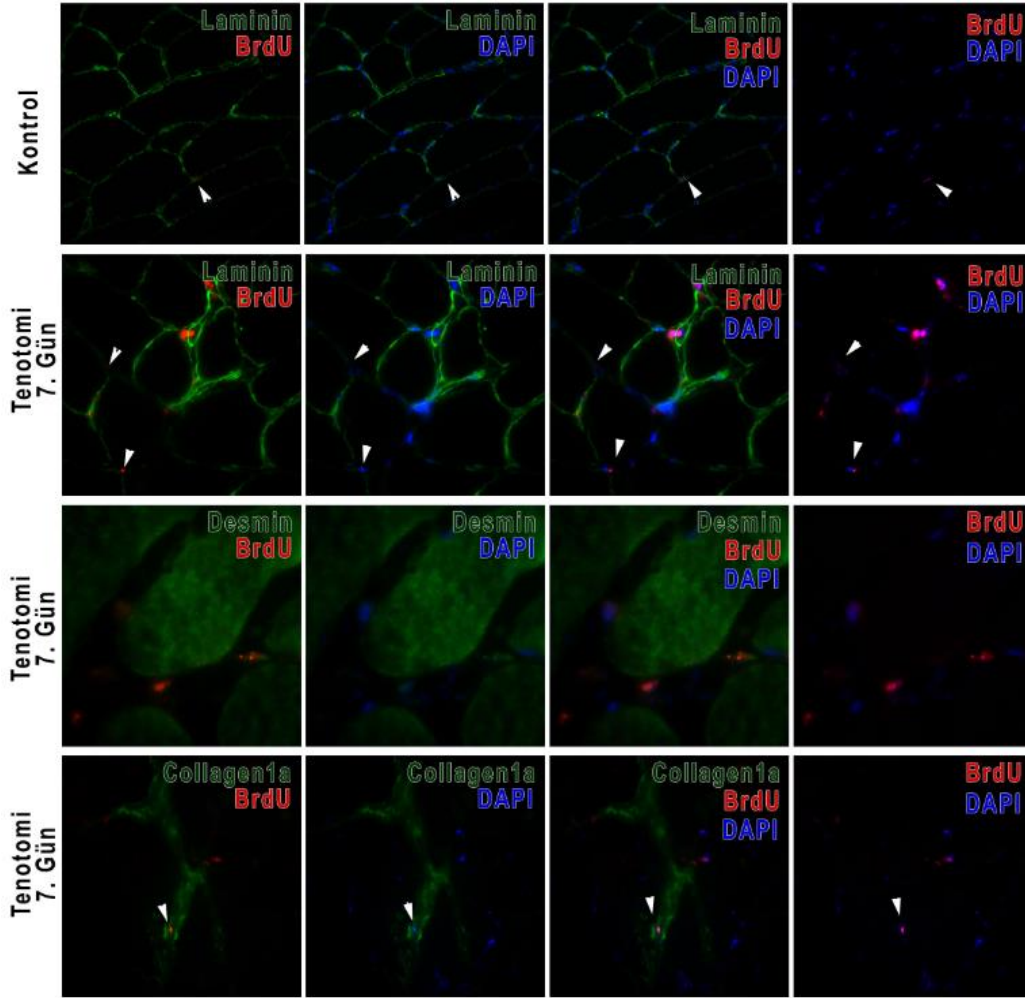
Tenotomi sürecinde aktive olan hücre populasyonları BrdU pozitifliği yönünden kontrol grubu ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Kontrolle, tenotomi 7. gün örneklerinde CD140a(+)/Sca1(-), CD140a(-)/Sca1(+) ve CD140a(+)/Sca1(+) hücre grupları ayrı ayrı incelendiğinde yalnız CD140a(-)/Sca1(+) hücre populasyonunun BrdU pozitifliği artış göstermiştir.

**Değişim oranları:**

CD140a(+)/Sca1(-): 1,1 → 1,30

CD140a(+)/Sca1(+): 7,6 → 3,18

CD140a(-)/Sca1(+): 4,8 → 13,86



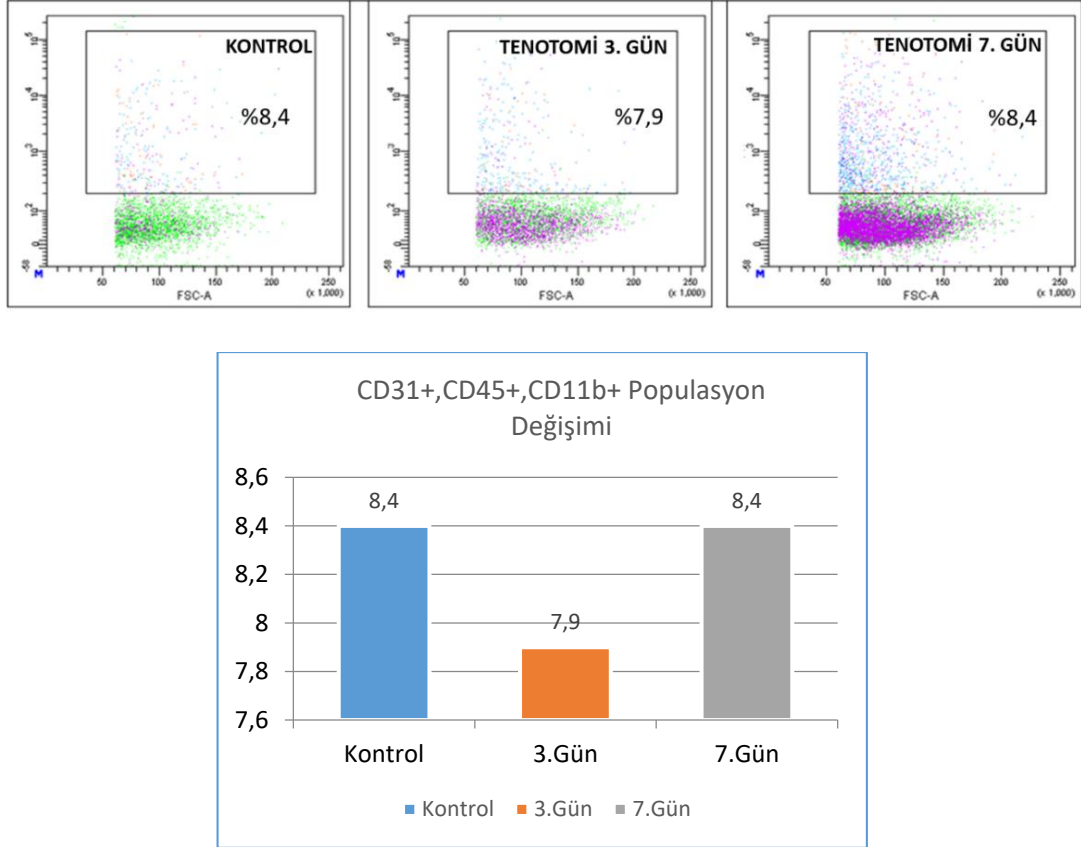
**Şekil 4.17.** Tenotomi sürecinde aktive olan stromal hücreler

Tenotomi sürecinin 7. gününde kas dokusunun yapısal proteinleri olan laminin, desmin ve kollajen ile BrdU pozitif hücreler analiz edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BrdU pozitif çekirdek miktarının arttığı ve kollajen ile aynı yerleşimde bulunduğu gözlenmektedir.

#### **4.2.3 Tenotomi sürecinde inflamatuvar hücre populasyon değişiminin incelenmesi**

İskelet kası dejenerasyon sürecinde stromal hücre aktivasyonunun, süreçte aktive olan inflamatuvar hücre populasyonu ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Tenotomi sonrası dejenerasyon sürecinde doğrudan kas lifi hasarı meydana gelmemektedir. Bu nedenle dokuda herhangi bir inflamatuvar yanıt meydana gelmesi beklenmemektedir. Ancak gerçekleştirilen işlemin cerrahi bir işlem olması nedeniyle,

dokunun işlem sırasında hasar görüp inflamasyonun işlem sürecinde tetiklenmesine yönelik risk bulunmaktadır. Gerçekleştirilen tenotomi modelinde inflamatuvar ve endotel hücre değişimi incelenmiştir.



**Şekil 4.18.** Tenotomi sürecinde inflamatuvar hücre değişimi

Tenotomi sürecinde stromal hücre değişiminin araştırılmasında CD45(-), CD31(-), CD11b(-) belirteçler olarak kullanılmaktadır. Bu belirteçler hasar ya da dejenerasyon sürecinde aktive olan inflamatuvar hücrelerin analizi ve stromal hücrelerin bu hücrelerden ayrımının sağlanması için kullanılmaktadır. Stromal hücre analizinde CD45(-)/CD31(-)/CD11b(-) populasyon analiz edilirken, inflamasyon yönünden analizde sadece CD45(+)/CD31(+)/CD11b(+) populasyon analiz edilmiştir. Gerçekleştirilen analiz sonucunda anlamlı bir oransal değişim gözlenmediği tenotomi sürecinde inflamatuvar hücre aktivasyonunun olmadığı gözlenmiştir.

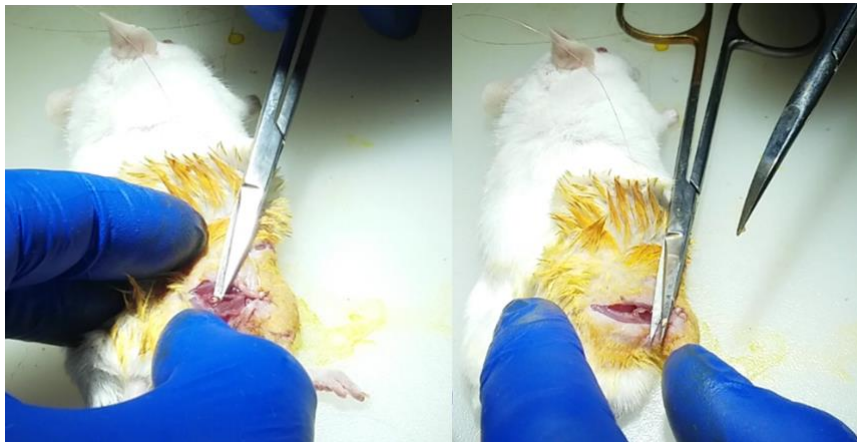
### 4.3. Denervasyon Modelinin Oluşturulması ve Dejenerasyon Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi

#### 4.3.1 Denervasyon Modelinin Oluşturulması

Kronik kas dejenerasyon modelini oluşturulmasında uygulanan model sistemlerden biri de kasın sinir iletiminin kesilerek kasılma uyarısının ortadan kaldırılmasını sağlamak ve dokunun kullanmamaya (*disuse*) bağlı olarak patolojik değişim göstermesidir. Bu kapsamda 8-12 haftalık erkek swiss farelerde sağ bacak siyatik sinir kesisi gerçekleştirilmiştir. Denervasyon sonrası 10 gün süre ile patolojik bulguların oluşması için beklenmiş olup, günlük BrdU enjeksiyonu yapılmıştır. 10. günün sonunda tüm sağ bacak kası çıkarılmış olup, dokuların bir kısmı histolojik analiz için ayrılmış olup, tek çekirdekli hücre izolasyonu yapılarak stromal hücre profillemesi yapılmıştır.



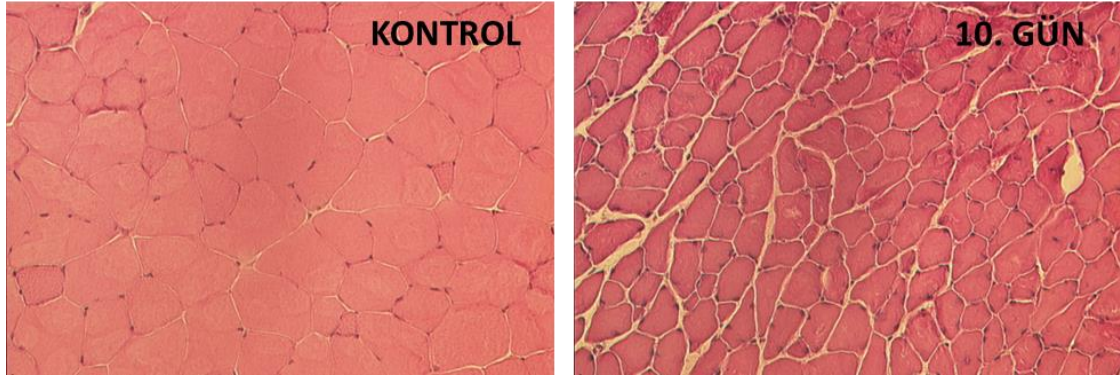
Şekil 4.19. Sağ bacak siyatik siniri



Şekil 4.20. Sağ bacak siyatik sinir kesisi



**Şekil 4.21.** Denervasyon sonrası 10. gün sağ bacak postur bozukluğu

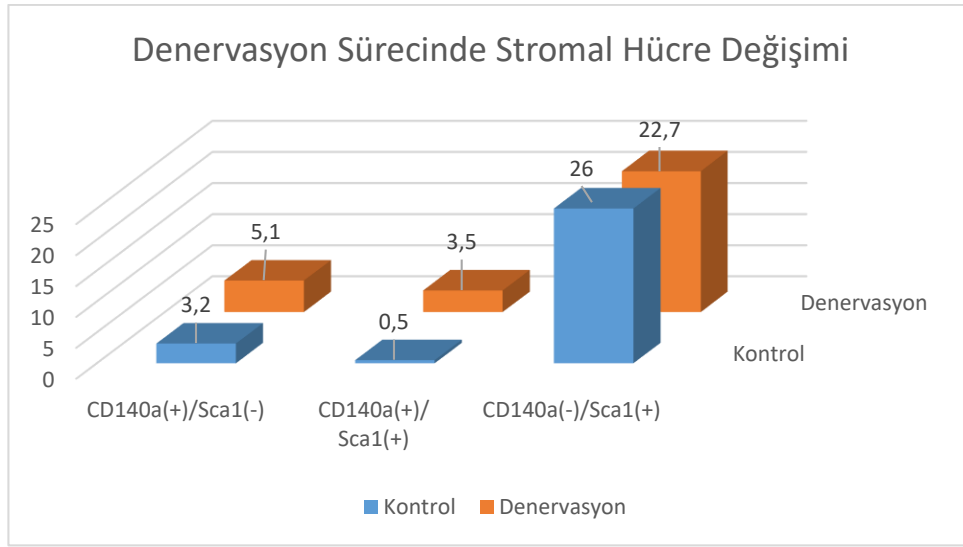
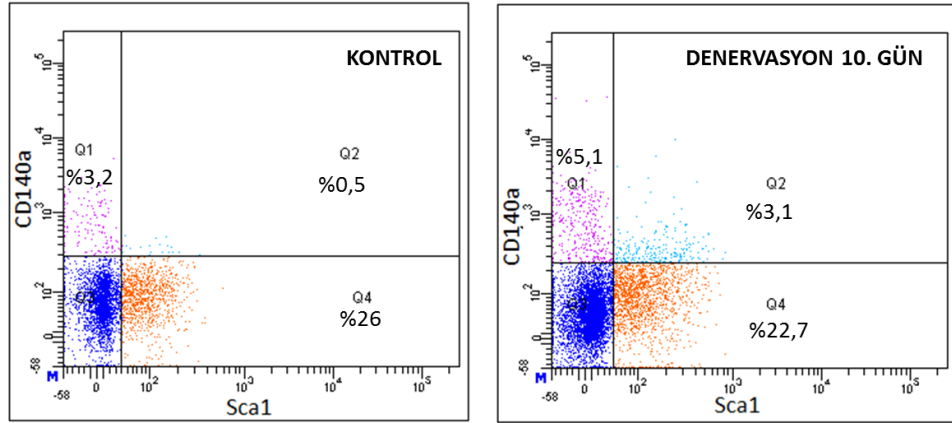


**Şekil 4.22.** Denervasyon sonrası 10. gün gastrocnemius kası H&E boyaması

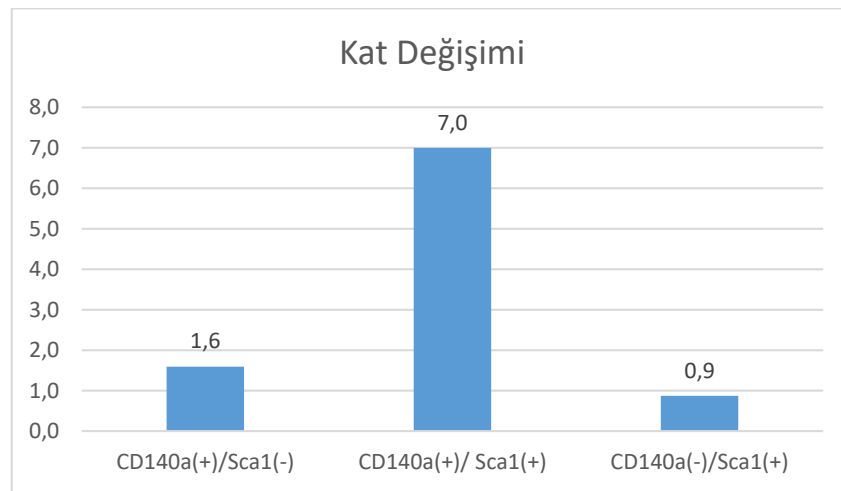
Siyatik sinir kesisini takip eden 10 günlük süreçte alt ekstremitte postur bozukluğunun devam ettiği gözlenmiştir. Gerçekleştirilen histolojik analiz sonucunda, denerve kas dokusu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kas lifi çaplarında sınırlı da olsa küçülme meydana geldiği, endomisial mesafenin açıldığı ve çekirdek çaplarının büyüdüğü gözlenmiştir.

#### **4.3.2 Dejenerasyon Sürecinde Stromal Hücre Populasyon Değişiminin İncelenmesi**

Denervasyonu takip eden 10 günlük süreçte tüm sağ bacak kasları çıkarılarak mononükleer hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası elde edilen hücreler stromal hücre profillemesi amacı ile işaretlenmiş olup, analiz edilmiştir.



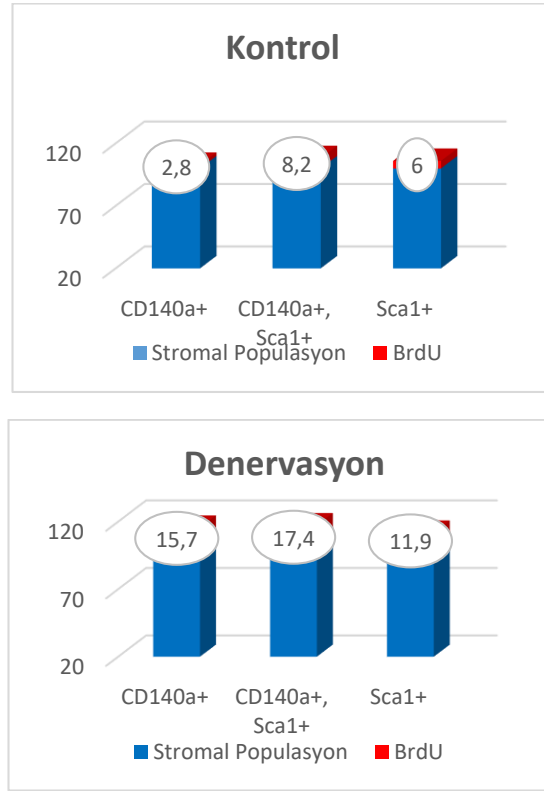
**Şekil 4.23.** CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) populasyon içinde denervasyon sonrası 10. gün stromal hücre değişim profili



**Şekil 4.24.** CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) populasyon içinde denervasyon sonrası 10. gün stromal hücre kat değişimi



arttığı, CD140a(-)/Sca1(+) popülasyonunun değişmediği, CD140a(+)/Sca1(+) popülasyonunun ise 8,7 kat arttığı gözlenmiştir.



**Şekil 4.27.** Denervasyon sonrası 10. gün stromal hücre aktivasyonu

Denervasyon sürecinde aktive olan hücre gruplarının yüzey belirteci ile analiz edilmesinin yanında bu hücreler BrdU pozitifliği yönünden araştırılmıştır. Kontrol ve denervasyon sonrası 10. gün örneği karşılaştırıldığında CD140a(+)/Sca1(-), CD140a(-)/Sca1(+) ve CD140a(+)/Sca1(+) hücre gruplarında BrdU pozitifliği artış göstermiştir. Her üç popülasyon yönünden BrdU pozitifliği artmış olmasına rağmen, denervasyon sürecinde yalnız CD140a(-)/Sca1(+), CD140a(+)/Sca1(+) hücre popülasyonları oransal artış göstermiştir. Bu iki popülasyon içinde sayısal (kat artışı) olarak en çok artış gösteren hücre popülasyonu ise CD140a(+)/Sca1(+).

#### **Değişim Oranları:**

CD140a(+)/Sca1(-): 2,8 → 15,7

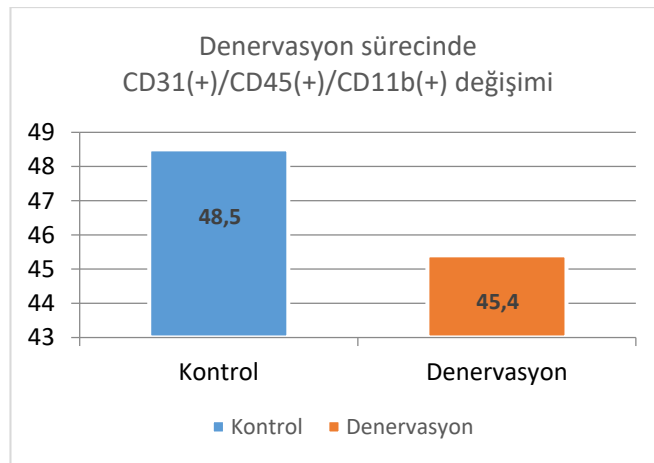
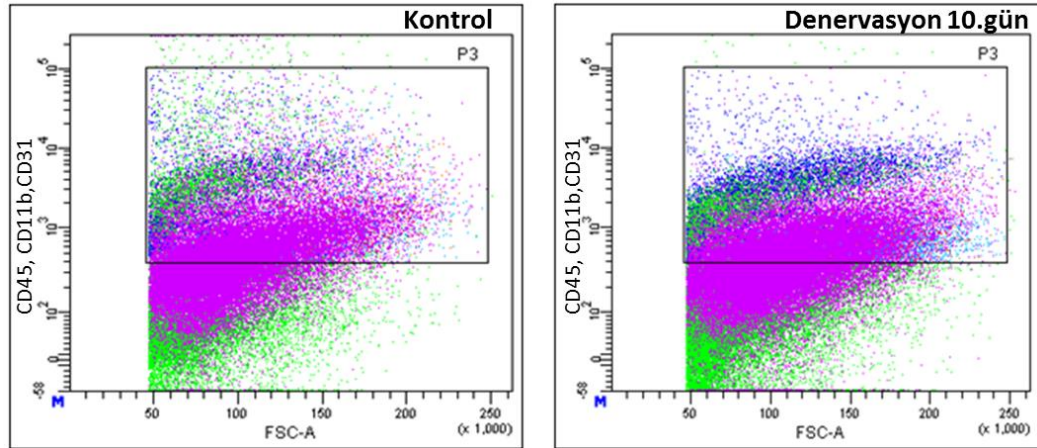
CD140a (+)/Sca1(+): 8,2 → 17,4

CD140a (-)/Sca1(+): 6 → 11,9



### 4.3.3 Denervasyon sürecinde inflamatuvar hücre popülasyon değişiminin incelenmesi

İskelet kası dejenerasyon sürecinde stromal hücre aktivasyonunun, süreçte aktive olan inflamatuvar hücre popülasyonu ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Tenotomi sürecindeki duruma benzer olarak, denervasyon sonrası dejenerasyon sürecinde kas lifi hasarı meydana gelmediği için dokuda inflamatuvar yanıt oluşmamaktadır. Ancak gerçekleştirilen analiz sonucunda, literatürde inflamatuvar cevaba bağlı aktivasyon gösteren hücre popülasyonunun (CD140a(+)/Sca1(+)) denervasyon sürecinin erken evrelerinde 7 katlık değişim göstermiş olması, oluşturulan modelde inflamasyon yönünde bir değişiklik olup olmadığı sorusunu getirmiştir. Bu kapsamda, tenotomi modelinde olduğu gibi inflamatuvar ve endotel hücre değişimi incelenmiştir.



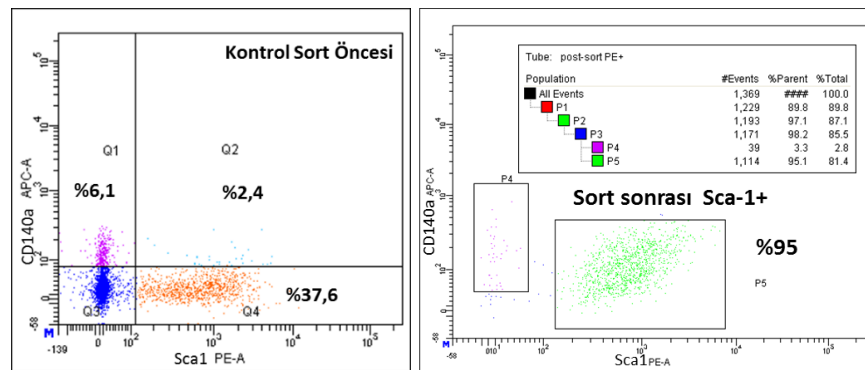
Şekil 4.28. Denervasyon sürecinde inflamatuvar hücre değişimi

Gerçekleştirilen analiz sonucunda denervasyon sürecinde oransal olarak inflamatuvar hücre miktarının %3 oranında azaldığı, dolayısıyla CD140a(+)/Sca1(+) populasyon aktivasyonunun denervasyon sürecinde inflamasyondan bağımsız olarak meydana geldiği gözlenmiştir.

#### 4.4 Stromal Hücre İzolasyonu, Kültürü ve Karakterizasyonu

##### 4.4.1 Stromal Hücre İzolasyonu

Gerçekleştirilen akut ve kronik hasar modellerinde inflamatuvar ve endotel hücre grubunun dışında kalan hücre populasyonları üç farklı stromal hücre belirteci ile analiz edilmiştir. “CD140a(PDGFRa)” spesifik bir hücre grubunu belirlemek için yeterli bir belirteçtir ancak “Sca1” fare çalışmalarında genel olarak kullanılan ve birçok hücre grubunun pozitif olduğu bir belirteçtir. Bu duruma ek olarak, üç farklı dejenerasyon modelinde gerçekleştirilen analizde hem inflamatuvar hücre aktivasyonunun meydana geldiği akut hasar sürecinde, hem de inflamatuvar hücre yanıtının bulunmadığı tenotomi sürecinde CD140a(-)/Sca1(+) hücre grubunun aktive olmuş olması, bu hücre grubunun aktivasyonu ve fibrozis gelişim sürecine olan katkısının ne olduğu sorusunu oluşturmuştur. Bu kapsamda, hem CD140a(-)/Sca1(+) hücre grubunun miyojenik farklılaşma yeteneği olmayan bir stromal hücre grubu olup olmadığının karakterize edilmesi, hem de dejenerasyon sürecinde aktivasyon mekanizmasının araştırılması amacıyla, hücreler flowsitometre aracılığı ile izole edilmiştir.

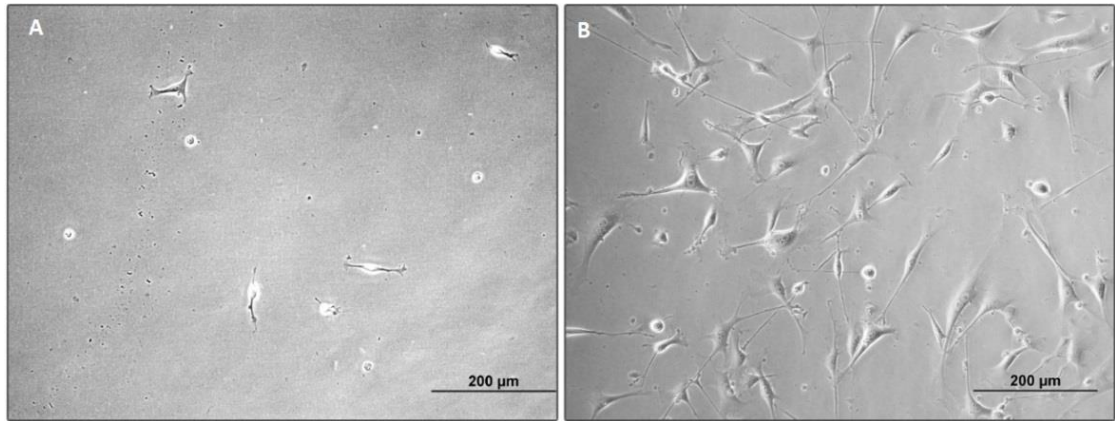


Şekil 4.29. CD140a(-)/Sca1(+) hücre populasyonunun izolasyon öncesi ve sonrası oranları

Gerçekleştirilen çalışmada “Sca1(+)/CD140a(-)/CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-)” hücre popülasyonu izole edilmiştir. İzole edilen popülasyonun saflık değerlendirmesi yapıldığında hücrelerin %95 oranında saf olarak izole edildiği gözlenmiştir.

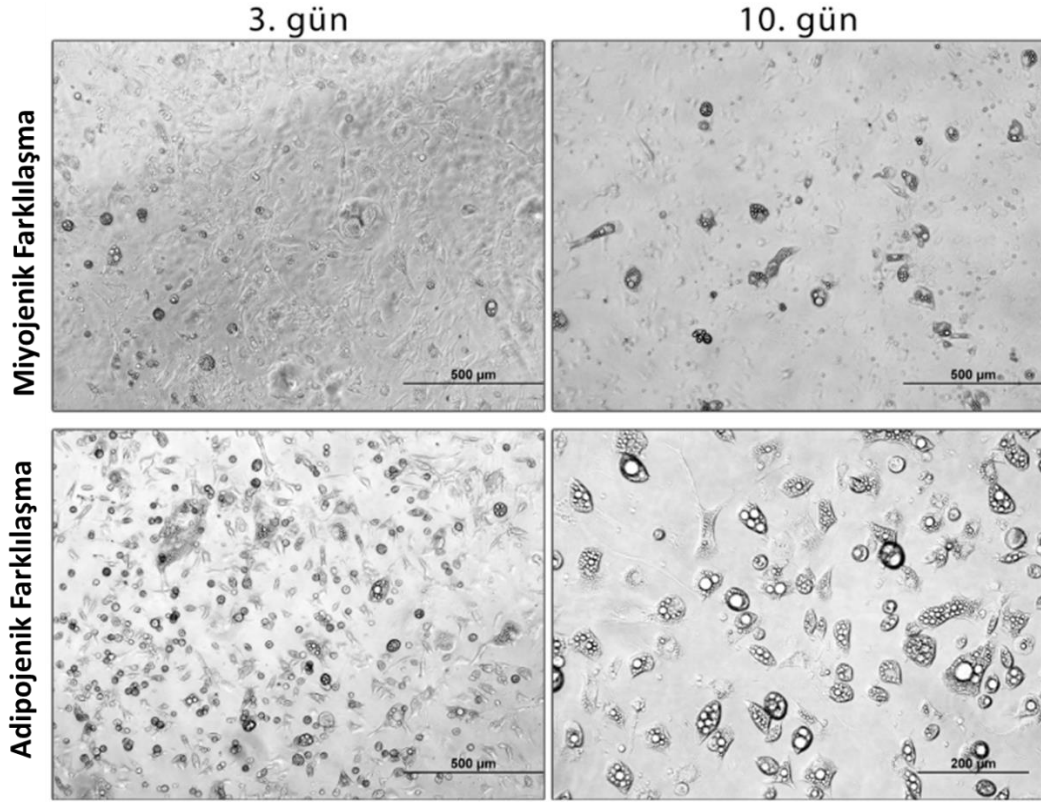
#### 4.4.2 Stromal Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu

İzole edilen CD140a(-)/Sca1(+) hücreler matrijel kaplı kültür plakalarına ekilmiş olup, 5ng/ml bFGF içeren kültür ortamında %5 CO<sub>2</sub>, 37 C<sup>0</sup>’de kültüre edilmiştir.



**Şekil 4.30.** CD140a(-)/Sca1(+)stromal hücre kültürü A) 24.saat B) 5. gün

İzolasyon sonrası hücreler morfolojik olarak incelendiğinde mezenkimal kök hücre benzeri bir morfolojide olduğu ancak mezenkimal kök hücrelerden ebat olarak küçük olduğu gözlenmiştir. Hücrelerin stromal hücre popülasyonu olup olmadığının gösterilmesi amacı ile miyojenik ve adipojenik farklılaşma ortamları uygulanmıştır.



**Şekil 4.31.** Miyojenik ve Adipojenik farklılaşma 3. gün ve 10. günler

Gerçekleştirilen farklılaşma çalışması sonucunda CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonununun 10 günlük bir süreçte adipojenik farklılaşma gösterdiği gözlenmiştir. Aynı hücre grubu miyojenik farklılaşma ortamına eklendiğinde hücrelerin füzyon ile miyotüp oluşumu göstermediği, aksine farklılaşmanın 5. gününde spontan adipojenik farklılaşmanın başlamış olduğu gözlenmiştir. 10. günün sonunda gerçekleştirilen morfolojik analizde CD140a(-)/Sca1(+) stromal hücrelerin adipojenik farklılaşmayı etkin bir şekilde gerçekleştirdiği ancak bu hücre grubunun miyojenik farklılaşma ortamında idame ettirilemediği ve herhangi bir miyojenik farklılaşmanın meydana gelmediği gözlenmiştir.

#### 4.4.3 Dejenerasyon Sürecinde Aktive Olan CD140a(-)/Sca1(+) Hücre Populasyonunun Yüksek Ölçekli RNA Dizileme Analizi ile İncelenmesi

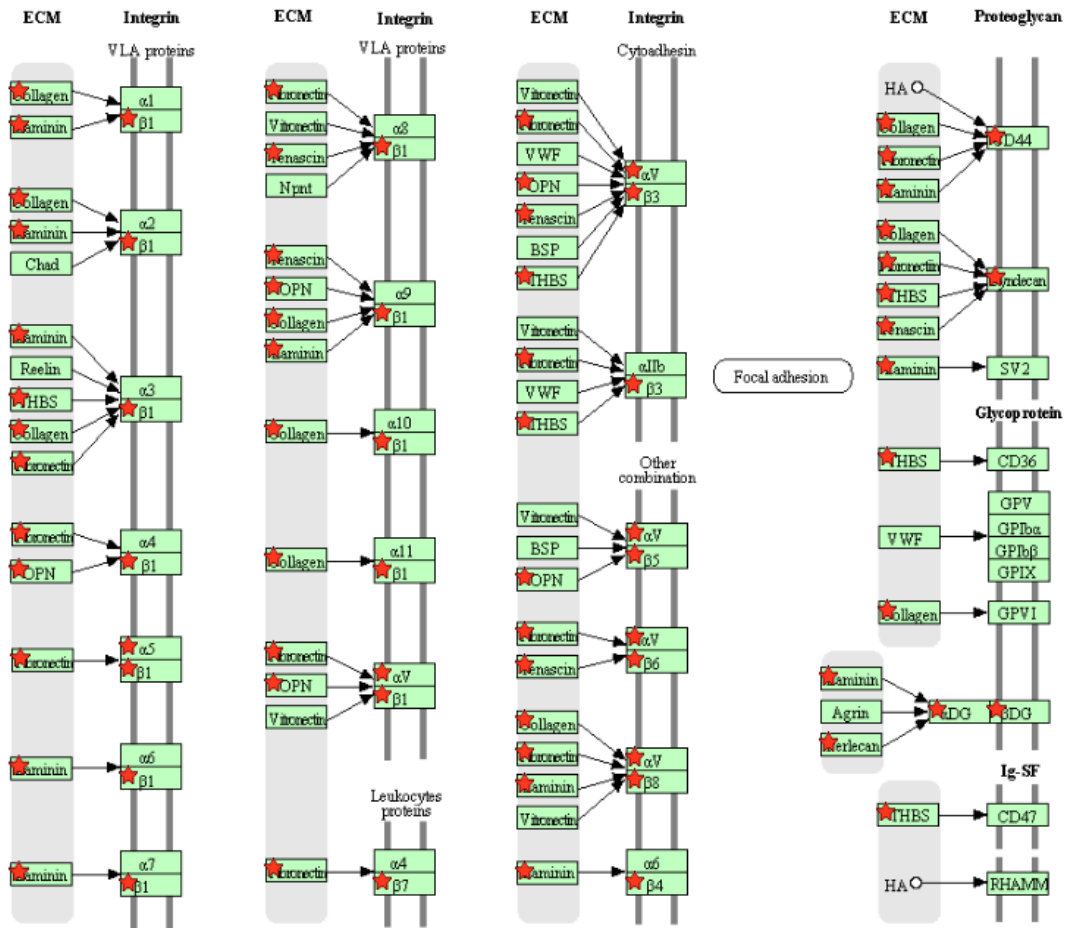
Oluşturulan üç farklı dejenerasyon modeli ile bu süreçte rol alan stromal hücreler karakterize edilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda CD45(-)/CD31(-)/CD11b(-)/CD140a(-)/Sca1(+) hücre populasyonunun hem akut hasarda hem de tenotomi sürecinde aktive olduğu gözlenmiştir. CD140a(+)/Sca1(+) yüzey belirteciye sahip FAP hücre aktivasyonunun inflamasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak, CD140a(-)/Sca1(+) hücre populasyonu hem inflamasyon ile ilişkili akut hasar sürecinde hem de inflamatuvar hücre yanıtının bulunmadığı tenotomi sürecinde aktive olmaktadır. Bu kapsamda, CD140a(-)/Sca1(+) hücre populasyonu kontrol kas grubu ve akut hasar 3. gün kas grubundan akimsitometri ile izole edilerek herhangi bir kültür işlemi uygulanmadan doğrudan RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örnekleri, yüksek ölçekli RNA dizi analizi ile transkriptom düzeyinde aktivasyon mekanizmaları incelenmiştir.

Yüksek ölçekli RNA dizileme çalışması sonucunda aktive olan CD140a(-)/Sca1(+) hücre populasyonu, kontrol kas grubundan izole edilen CD140a(-)/Sca1(+) hücre grubu ile karşılaştırmalı olarak analiz edildiğinde, stromal hücre aktivasyon sürecinde 796 genin ifadesinin arttığı, 480 genin ise ifadesinin azaldığı gözlenmiştir (EK-1). İfadesi artan ve azalan genlerin "*DAVID Functional Annotation Tool*" ile küme(*cluster*) yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

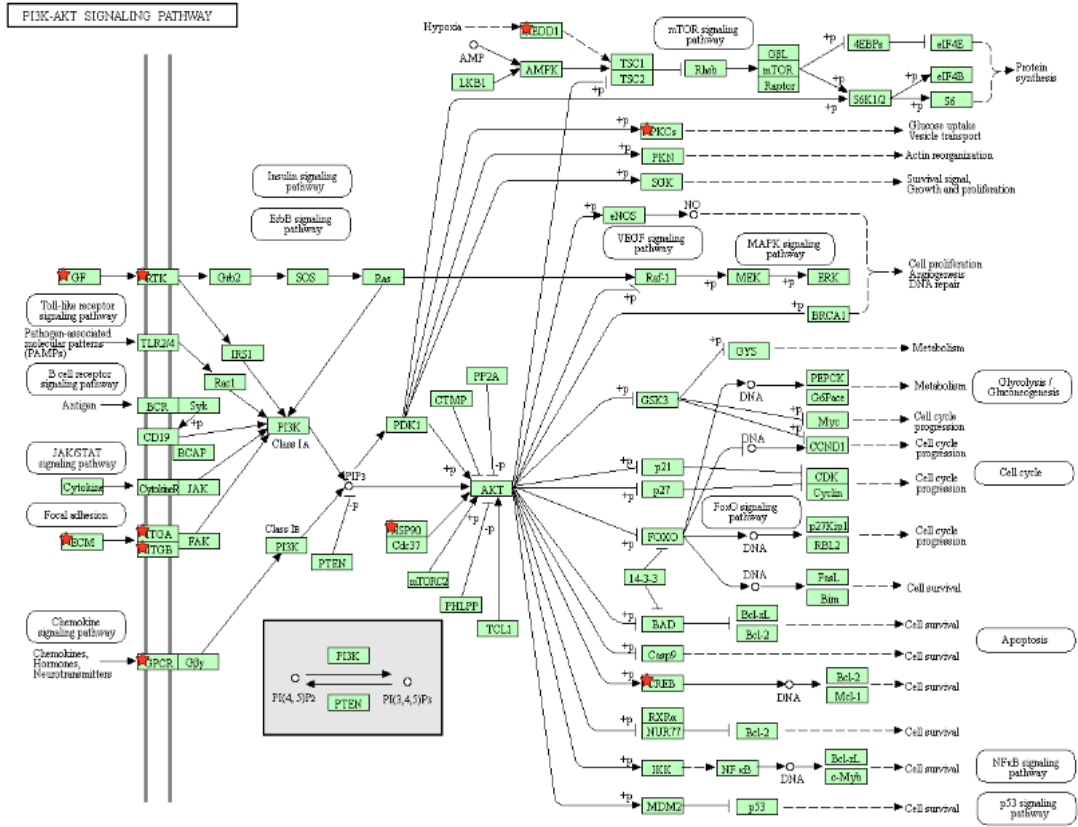
**Tablo 4.1.** DAVID Annotation Tool Cluster Analizi

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 44.57		Count	P_Value	Benjamini
	UP_KEYWORDS	Secreted	104	3,10E-57	6,70E-55
	GOTERM_CC_DIRECT	extracellular region	106	5,20E-52	1,20E-49
	UP_SEQ_FEATURE	signal peptide	134	9,50E-51	8,80E-48
	UP_KEYWORDS	Signal	142	2,70E-46	2,90E-44
	UP_KEYWORDS	Glycoprotein	129	4,60E-44	3,30E-42
	UP_SEQ_FEATURE	glycosylation site:N-linked (GlcNAc...)	124	8,50E-36	3,90E-33
	GOTERM_CC_DIRECT	extracellular space	77	6,60E-31	3,80E-29
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 38.69		Count	P_Value	Benjamini
	GOTERM_CC_DIRECT	proteinaceous extracellular matrix	51	2,80E-43	3,20E-41
	GOTERM_CC_DIRECT	extracellular matrix	46	3,20E-38	2,50E-36
	UP_KEYWORDS	Extracellular matrix	40	9,30E-37	5,00E-35
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 14.19		Count	P_Value	Benjamini
	KEGG_PATHWAY	ECM-receptor interaction	21	1,80E-21	2,30E-19
	KEGG_PATHWAY	Focal adhesion	24	2,80E-17	1,80E-15
	KEGG_PATHWAY	PI3K-Akt signaling pathway	22	1,70E-10	7,30E-09
	KEGG_PATHWAY	Protein digestion and absorption	13	2,00E-10	6,30E-09
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 7.44		Count	P_Value	Benjamini
	UP_KEYWORDS	Collagen	20	6,00E-21	2,20E-19
	GOTERM_CC_DIRECT	collagen trimer	20	4,60E-20	2,10E-18
	INTERPRO	Collagen triple helix repeat	17	6,80E-17	5,40E-14
	GOTERM_BP_DIRECT	collagen fibril organization	13	1,30E-14	1,00E-11
	UP_KEYWORDS	Hydroxylation	13	5,50E-11	1,20E-09
	KEGG_PATHWAY	Protein digestion and absorption	13	2,00E-10	6,30E-09
	INTERPRO	Fibrillar collagen, C-terminal	7	5,30E-10	5,20E-08
	SMART	COLFI	7	3,60E-09	2,50E-07
	GOTERM_MF_DIRECT	extracellular matrix structural constitu	9	1,30E-08	7,90E-07
	UP_SEQ_FEATURE	domain:Fibrillar collagen NC1	6	4,80E-08	6,40E-06
	UP_SEQ_FEATURE	propeptide:C-terminal propeptide	5	6,00E-07	6,90E-05
	GOTERM_MF_DIRECT	platelet-derived growth factor binding	5	6,60E-06	2,60E-04
	UP_SEQ_FEATURE	propeptide:N-terminal propeptide	4	3,00E-05	2,00E-03
	KEGG_PATHWAY	Amoebiasis	9	4,70E-05	8,60E-04
	UP_SEQ_FEATURE	region of interest:Triple-helical region	5	4,70E-05	2,60E-03
	GOTERM_BP_DIRECT	protein heterotrimerization	5	6,00E-05	7,00E-03
	GOTERM_BP_DIRECT	blood vessel development	7	1,70E-04	1,80E-02
	GOTERM_BP_DIRECT	skeletal system development	8	2,50E-04	2,00E-02
	GOTERM_CC_DIRECT	collagen type V trimer	3	3,70E-04	6,50E-03
	GOTERM_BP_DIRECT	skin development	6	5,60E-04	3,80E-02
	KEGG_PATHWAY	Platelet activation	8	6,50E-04	1,00E-02
	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to amino acid stimul	6	2,20E-02	4,00E-01
	GOTERM_MF_DIRECT	SMAD binding	3	1,20E-01	6,50E-01

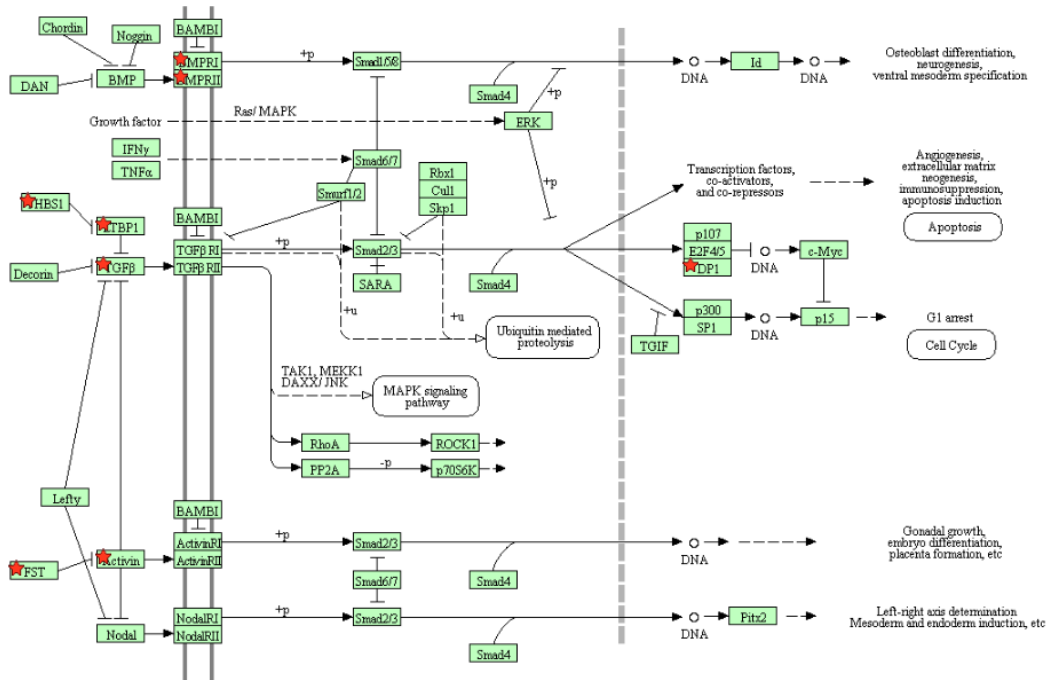
Sca1(+)/CD140a(-) hücrelerin aktivasyon sürecinde kat artışı gösteren genlerin farklı veri bankalarından elde edilen kümeleme (*cluster*) analizi sonucunda ifade artışı gösteren genlerin büyük bir çoğunluğunun ECM yapılanması ve hücre aktivasyonunda önemli role sahip PI3K/Akt yolağı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 4.32.** İfade artışı gösteren genlerde yolak analizi. ECM-reseptör etkileşimi. \*RNAseq çalışmasında ifade artışı gösteren genler



Şekil 4.33. İfade artışı gösteren genlerde yolak analizi. PI3K-Akt Sinyal Yoluğı.\*RNaseq çalışmasında ifade artışı gösteren genler



Şekil 4.34. İfade artışı gösteren genlerde yolak analizi. TGF-Beta Sinyal Yoluğı.\*RNaseq çalışmasında ifade artışı gösteren genler



Gerçekleştirilen yolak analizi sonucunda, gen ifade artışı gösteren genler sınıflandırılmıştır. Bu kapsamda, ECM faktörleri, hücre aktivasyonunda ana rol oynayan PI3K-Akt sinyal yolağının ana düzenleyicileri ve fibrozis gelişiminin ana sorumlusu olan TGF-beta sinyal yolağında görev alan genlerde ifade artışı gözlenmiştir. Bu genler dışında, Wnt ligandlarında, FGF (*Fibroblast growth factor*), IGF (*insülin like growth factor*) faktörlerinde de gen ifade artışı gözlenmektedir. *DAVID Functional Annotation Tool* yolak analizinde bu faktörler kanser yolları kümeleme (*cluster*) analizi kapsamında değerlendirilmiştir.

**Tablo 4.2.** Aktive olmuş CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunda artış gösteren ve fibrozis ile ilişkili genler (gri)

Gen Listesi	Kat Artışı
Latent transforming growth factor beta binding protein 2(Ltbp2)	40,1
Collagen, type V, alpha 1(Col5a1)	38,0
Collagen, type III, alpha 1(Col3a1)	31,2
Elastin(Eln)	30,8
Asporin(Aspn)	30,5
Collagen, type I, alpha 1(Col1a1)	29,2
WNT1 inducible signaling pathway protein 1(Wisp1)	28,7
Leucine rich repeat containing 15(Lrrc15)	27,0
Cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase(Cilp)	27,0
Collagen triple helix repeat containing 1(Cthrc1)	25,0
Collagen, type VI, alpha 3(Col6a3)	22,8
Amphiregulin(Areg)	21,5
Collagen, type VI, alpha 2(Col6a2)	20,5
Collagen, type V, alpha 2(Col5a2)	20,4
Collagen, type VI, alpha 1(Col6a1)	20,4
Periostin, osteoblast specific factor(Postn)	20,2
Lysyl oxidase(Lox)	20,1
Collagen, type I, alpha 2(Col1a2)	20,0
Tachykinin 1(Tac1)	19,2
Secreted frizzled-related protein 2(Sfrp2)	19,1
Cyclin-dependent kinase 1(Cdk1)	18,3
Epiregulin(Ereg)	18,2
Collagen, type XII, alpha 1(Col12a1)	17,7
Collagen, type VIII, alpha 1(Col8a1)	17,6
Fibrillin 1(Fbn1)	17,3
Pleiomorphic adenoma gene-like 1(Plagl1)	16,4
Secreted phosphoprotein 1-Osteopontin (Spp1)	16,4

**Tablo 4.2.** (Devam) Aktive olmuş CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunda artış gösteren ve fibrozis ile ilişkili genler (gri)

Reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain(Rcn3)	16,3
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N(Ptprn)	16,3
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N(Ptprn)	16,3
insulin-like growth factor 1(Igf1)	12,7
collagen, type XIV, alpha 1(Col14a1)	12,4
İnhibin beta-A(Inhba)	12,2
Transforming growth factor, beta 2(Tgfb2)	10,2
tenascin C(Tnc)	10,0

Aktive olan CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 10 kat ve üzeri ifade artışı gösteren genler listelenmiştir. Genlerin %70'inin ECM regülasyonu ve fibrozis ile ilişkili olduğu gözlenmiştir.

**Tablo 4.3.** Aktive olmuş CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunda artış gösteren, ECM yeniden modellenmesi ve fibrozis ile ilişkili genler

Gen Listesi	Kat Artışı
Collagen , type V, alpha 3 (Col5a3)	9,3
Collagen , type XVI, alpha 1 (Col16a1)	9,2
Fibroblast activation Protein (Fap)	9,2
Fibronectin type III domain containing 1 (Fndc1)	8,5
Selanoprotein M (Selm)	8,5
Transforming growth factor, beta induced (Tgfb1)	8,3
Fibroblast growth factor 18 (Fgf18)	8,1
Fibronectin1 (FN1)	8,1
ADAM12	7,5
TIMP1	7,0
Fibroblast growth factor 2 (Fgf2)	7,0
Col27A1	6,1
Follistatin (Fst)	4,8
Klf5	4,8
Matrix metalloproteinase (Mmp2)	4,0

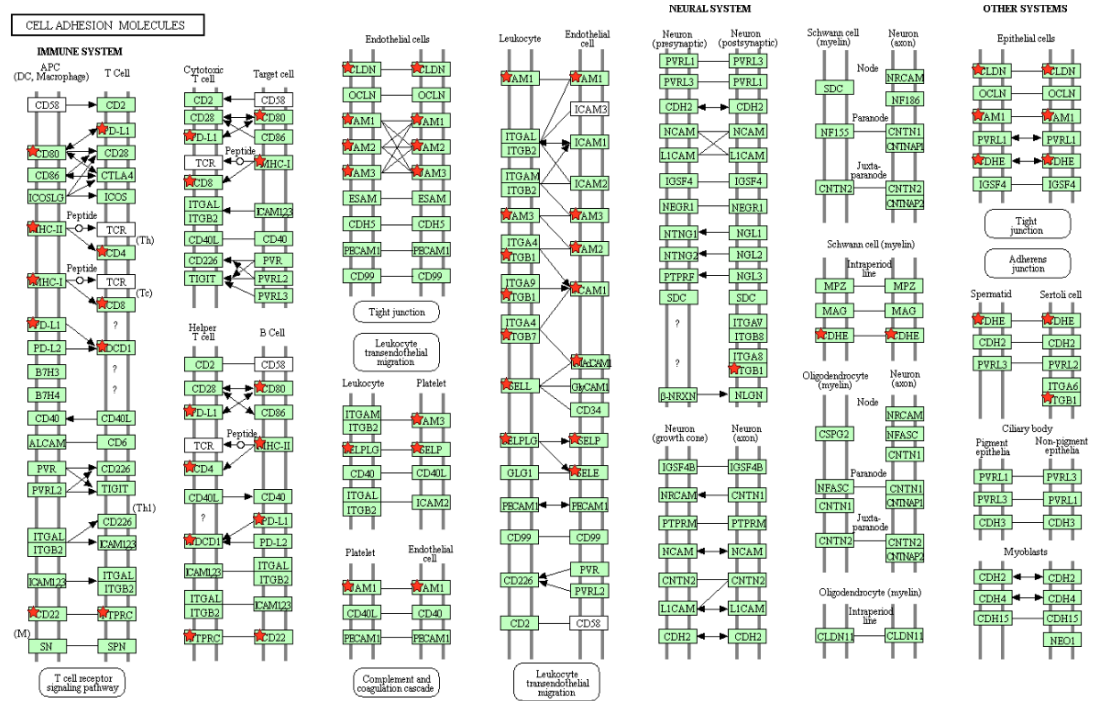
Aktive olmuş CD140a(-)/Sca1(+) hücre grubunda en yüksek kat artış değişimi gösteren genlere ek olarak, gen ifade artışı gösteren diğer genler incelendiğinde fibrozis ve ECM'in yeniden modellenmesinde rol alan yapısal proteinler ve proteaz

aktivitesine sahip faktörlerin de gen ifadesi yönünden değişim gösterdiği gözlenmiştir.

**Tablo 4.4.** Aktive olmuş CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunda artış gösteren diğer faktörler.

Gen Listesi	Kat Artışı
Transforming growth factor beta 1 (Tgfb1)	2,5
Platelet derived growth factor alpha (Pdgfa)	2,1

FAP hücrelerinin düzenlenmesinde görev alan iki ana sinyal molekülünün CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonu aktivasyon sürecindeki gen ifade değişimleri incelendiğinde TGF-beta ve PDGFA'nın 2 kat artış gösterdiği gözlenmiştir.

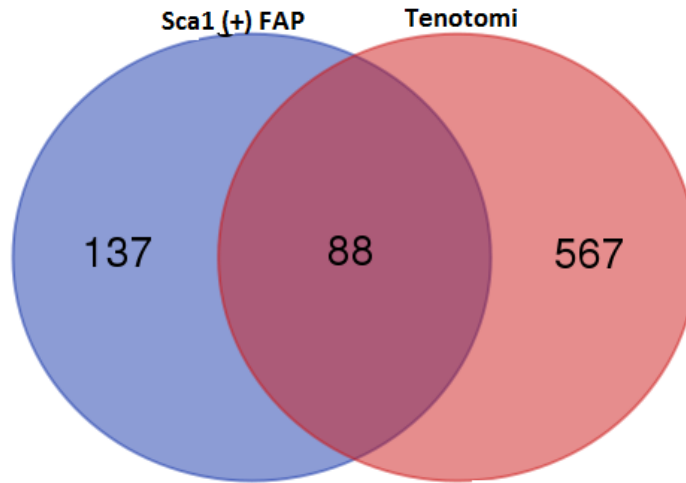


**Şekil 4.35.** İfade azalışı gösteren genlerde yolak analizi. Hücre adezyon molekülleri \* RNAseq çalışmasında ifade azalışı gösteren genler

Aktive olan CD140a(-)/Sca1(+) hücre grubunda en yüksek ifade azalışı gösteren genler listelendiğinde, hücrelerin adezyon molekül ifadelerinin azaldığı gözlenmiştir.

#### 4.4.4 Tenotomi Sürecinde Total Kas Dokusunda Değişim Gösteren Gen İfade Değişimi ile Dejenerasyon Sürecinde Aktive Olan CD140a(-)/Sca1(+) Hücre Populasyonunun Yüksek Ölçekli RNA Dizileme Analizinin Karşılaştırılması

Yukarıda kısım Bkz. Tablo 4.2-4.4'de CD140a(-)/Sca1(+) hücre populasyonunun aktivasyon sürecinde meydana gelen gen ifade değişimleri incelenmiştir. Ancak, dokuda meydana gelen patolojik değişim sadece stromal hücre boyutunda olmayıp, doku bütünlüğünü oluşturan her hücresel bileşen kapsamında gerçekleşmektedir. Daha önce araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirilen tenotomi çalışmalarında doku genelinde transkriptom değişimi araştırılmıştır(49). Farklı bir transkriptom platformu tarafından elde edilen bulgular, CD140a(-)/Sca1(+) hücrelerin yüksek ölçekli RNA dizileme çalışması sonucu ile sadece aktive olan gen listeleri kapsamında karşılaştırılmıştır.

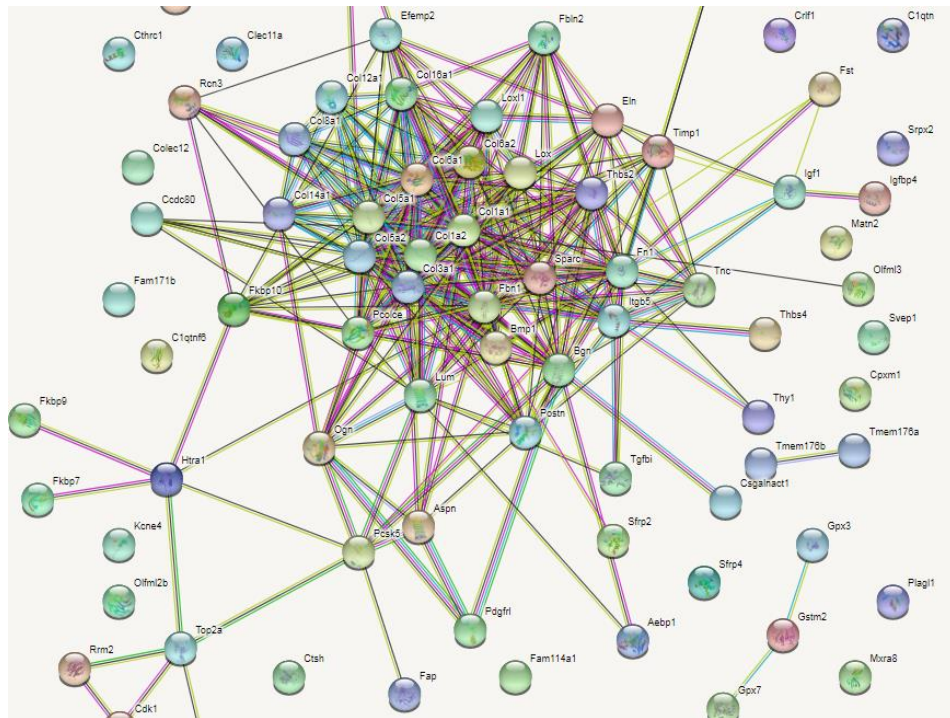


Şekil 4.36. Tenotomize kas dokusu ve CD140a(-)/Sca1(+) hücrelerin gen listelerinin karşılaştırılması

Similarity Score: <span style="color: red;">■</span> Very High (0.75-1) <span style="color: orange;">■</span> High (0.5-0.75) <span style="color: yellow;">■</span> Moderate (0.25-0.5) <span style="color: lightgrey;">■</span> Low (<0.25)			
#	Category	Term	Kappa
1	KEGG_PATHWAY	<a href="#">ECM-receptor interaction</a>	1.00
2	KEGG_PATHWAY	<a href="#">PI3K-Akt signaling pathway</a>	0.88
3	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Focal adhesion</a>	0.84
4	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Protein digestion and absorption</a>	0.59
5	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Amoebiasis</a>	0.53
6	INTERPRO	<a href="#">Collagen triple helix repeat</a>	0.53

Şekil 4.37. Tenotomi kas dokusu ve tenotomi sürecinde aktive olan CD140a(-)/Sca1(+) hücrelerin ifade artışı gösterdiği ortak genler için yolak analizi

Tenotomi transkriptom verileri ile aktive olmuş CD140a(-)/Sca1(+) transkriptom verilerinin karşılaştırılması sonucunda gen ifadesi artışı yönünden ortaklık gösteren 88 gen 'DAVID Annotation Tool' ile gerçekleştirilen yolak analizinde, ECM-reseptör ilişkisi, Fokal adezyon, PI3K-Akt sinyal yolağı yönünden en yüksek benzerliği göstermiştir. Bu genler, protein-protein etkileşimi yönünden incelendiğinde genlerin yarısından fazlasının ECM ile ilişkili olduğu ve birbirleri ile kuvvetli etkileşim içinde buldukları gözlenmiştir



**Şekil4.38.** Tenotomi sürecinde ve CD140a(-)/Sca1(+) hücre aktivasyonunda ifade artışı gösteren genlerin protein-protein etkileşim diyagramı.

\*<https://stringdb.org/cgi/network.pl?taskId=C1vh0ytXSPgw>

## 5. TARTIŞMA

İskelet kası hastalıklarında ya da senil işlev kaybı durumunda kas lifi atrofisi, fibrozis ve dejenerasyon tipine bağlı olarak yağlı dejenerasyon gözlenmektedir. İskelet kası rejenerasyonunu arttırmaya yönelik tedavi metodolojileri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu tedavilerin en başında, kas dokusu ya da kas dokusu dışı kaynaklı hücrelerin keşfi ve rejenerasyon potansiyellerine yönelik prelinik ve klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (50, 51). Bu hücrel tedavi denemelerine ek olarak, mutasyona özgül yaklaşımlar da benimsenerek, dokuda eksik bulunan yapısal protein genlerinin yerine konmasını hedefleyen genetik yaklaşımlar da uygulanmıştır. Ancak, gerçekleştirilen tüm genetik ve hücrel klinik tedavi denemelerinde kas dokusunun rejenerasyonu ve fenotipe yansıyan bir iyileşme sağlanamamıştır. Bu durumun temel nedenleri incelendiğinde **a)** iskelet kası projenitör hücrelerinin nişleri ile birlikte kullanıldığı zaman ancak beklenen etkinlikte rejenerasyonu gerçekleştirdiği (kas kök hücresi uygulaması yerine kas lifi uygulaması) **b)** niş olmadan aktarılan iskelet kas dokusuna spesifik projenitör hücrelerin dejenere kas dokusunda değişen mikroçevre nedeniyle iskelet kasına farklılaşamadığı, ya da istenilenden farklı bir doku tipine farklılaştığı **c)** atrofi ve devam eden dejenerasyon sebebiyle rejenerasyon sinyal mekanizmalarının bozulması **d)** dokuda meydana gelen yaygın fibrozis nedeniyle ECM esnekliğinin ve dinamikliğinin kaybolması nedeniyle rejenerasyon sinyallerinin ve klinik yaklaşımlarda uygulanan genetik ve hücrel faktörlerin hasarlı bölgeye aktarılamaması sıralanmaktadır (22). İskelet kası rejenerasyonu ve tamire yönelik geliştirilen klinik yaklaşımların beklenen etkinliği gösterememesinin ana nedeni, dejenerasyon patolojisi sonucu gelişen fibrozistir. Fibrozisin dokunun esneklik ve kasılma kabiliyetini bozmasının yanında kas atrofisinin ilerlemesini hızlandırıcı etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle iskelet kası rejenerasyonu ve kas hastalıklarına yönelik geliştirilecek olan tedavi yaklaşımlarında fibrozis fiziksel bir bariyer oluşturarak inhibitör etki göstermektedir. Bu durumun anlaşılmasını takip eden süreçte fibrozisin hücrel gelişim mekanizmalarına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Kas rejenerasyonuna yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda ağırlıklı olarak iskelet kas dokusuna farklılaşma yeteneği bulunan projenitör hücreler tanımlanmaya çalışılmış

olup, stroma kökenli ve patoloji ile ilişkili hücre grupları ikinci planda değerlendirilmiştir. Bu nedenle literatürde kas dokusu dejenerasyon sürecine eşlik eden stromal kökenli hücre gruplarına yönelik sınırlı miktarda bilgi bulunmaktadır (52).

Fibrozisin rejenerasyon önündeki en önemli engel olduğunun anlaşılması üzerine stromal hücre karakterizasyonuna yönelik çalışmalar hız kazanmış olup, bu hücrelerin karakterizasyonları ve yüzey belirteçlerine yönelik tanımlayıcı çalışmalar yayınlanmıştır. Bu konudaki ilk tanımlayıcı çalışma, 2010 senesinde Joe AW. ve Uezumi A. tarafından yüzey belirteçleri ile birlikte fibroadipojenik projenitörlerin (FAP) tanımlanması ile başlamıştır (26, 27). Gerçekleştirilen bu iki öncül çalışmada bu hücrelerin CD31(-)/CD45(-)/CD140a(+)/Sca1(+) oldukları ve akut ya da kronik hasar süreci ile birlikte artış gösterdikleri, fibrotik bölgelerde yoğunlaştıkları gösterilmiştir. Takip eden süreçte, 2014 yılında Rossi F. ve arkadaşları tarafından yayınlanan mekanistik çalışmada bu hücrelerin inflamasyon ile yakın ilişkili olarak regüle edildiği ve doku idamesi için gerekli olan hücresel düzenlemenin TNF-alfa ve TGF-beta aracılığı ile gerçekleştirildiği tanımlanmıştır. Bu iki ana düzenleyici sinyal mekanizmasının bozulması sonucunda da dokuda fibrozis gelişiminin tetiklendiği gösterilmiştir(32). Farklı gruplar tarafından gerçekleştirilen FAP hücrelerine yönelik çalışmalar incelendiğinde, farklı kombinasyonda yüzey belirteçlerinin kullanıldığı anlaşılmaktadır. Bu belirteçler: CD31(-)/CD45(-)/CD140a(+), CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-)/CD140a(+)/Sca1(+), CD31(-)/CD45(-)/Lin(-)/Sca1(+) şeklindedir (31, 53, 54). Bu konudaki bir görüş sadece CD31(-)/CD45(-)/Sca1(+) hücrelerin de fibroadipojenik projenitör olduğu yönündedir (26). Uezumi ve arkadaşları ise FAP çalışmaları için en iyi belirtecin insanda da karşılığı bulunan PDGFRa (CD140a) olduğunu ileri sürmektedir (54). FAP karakterizasyonunda yüzey belirteçleri yönünden farklılık göstermiş olmasına rağmen bu çalışmalarda analiz edilen hücre gruplarının iskelet kas dokusunun yeniden modellenmesinde ve patoloji gelişiminden sorumlu olduğunu göstermiştir.

İskelet kas dokusunda atrofi ve fibrozis ile sonuçlanan kronik dejenerasyonun temelinde, yapısal protein eksiklikleri (Duchenne ve limb-girdle kas distrofileri),

metabolik ve sistemik değişimlere bağlı gelişen kaşeksi (kanser vb.) , hareketsizleştirme (immobilizasyon-kırıklara bağlı açılama ve kas kaybı), yaşlılığa bağlı sarkopeni ve sinir iletimi hasarına bağlı denervasyon olarak sıralanmaktadır. Her birinin fizyopatolojisi birbirinden farklı olmakla beraber gözlenen patolojik tablo değişmemektedir (55, 56). Bu tez çalışmasında kullanılan deneysel modeller yukarıda sıralanan stroma patolojilerini taklit eden deneysel modellerdir. Kardiyotoksin enjeksiyonu ile oluşturulan akut hasar ve tamiri genel bir hasar tamiri gözlem modelidir. Diğer yönden, insanda gözlenen kronik kas dejenerasyonunun stromal bileşenlerini sergileyen tendon kesisi ve siyatik sinir kesisi ise sırasıyla fibrozis ve yağlı dejenerasyon gelişimini taklit eden modellerdir.

Bu tez çalışmasının temel aldığı başlıca dayanak noktaları, fibrozisin kas rejenerasyonunu etkileyen ana sınırlandırıcı faktör olması, farklı oluşum mekanizmalarına sahip dejenerasyon patolojilerinin ortak noktasının kas atrofisi ve fibrozis olması, farklı iskelet kas dejenerasyonu süreçlerinde rol alan stromal hücre popülasyonlarının tanımlanmamış olmasıdır. Bu kapsamda, literatürde stromal hücrelere yönelik tanımlanmış olan yüzey belirteçleri (CD31(-), CD45(-), CD11b(-), Sca1(+), CD140a(+)) kullanılarak, üç farklı tanımlayıcı yönünden (hücrelerin CD140a(+)/Sca1(-) olması, CD140a(+)/Sca1(+) olması ve CD140a(-)/Sca1(+) olması) üç farklı deneysel dejenerasyon sürecinde stromal hücre popülasyon dinamiği ve aktivasyon mekanizması incelenmiştir

### **5.1 Akut Hasar Sürecinde İnflamasyon ile İlişkili Değişen Stromal Hücre Popülasyonu**

Akut kas hasarı deney modeli dokuda kas hasarı oluşturularak, rejenerasyon sinyallerinin ve bu sürece eşlik eden hücrel mekanizmaların gözlenmesi için kullanılan en iyi tanımlanmış model sistemdir. Sadece iskelet kası kök hücreleri değil aynı zamanda dokunun yeniden modellenmesinde ve ECM yapılanmasında görev alan stromal hücre aktivasyonlarının da çalışılmasında geçerli bir deney sistemidir. Fibroadipojenik projenitörler kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda da ağırlıklı olarak kardiyotoksin ya da noteksin enjeksiyonu ile akut kas dejenerasyonu



uygulanmaktadır. Literatürde akut hasar sürecinde FAP'ların aktivasyon oranlarına yönelik bilgiler mevcuttur (26, 27). Bu nedenle, akut hasar modeli, FAP çalışmalarında pozitif kontrol grubunu oluşturmaktadır. Tez çalışması kapsamında da kronik modellerdeki aktivasyon süreçlerinin karşılaştırılması amacıyla pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Akut hasar sonrası 3. gün örneklerinde CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-) populasyon içinden kontrol grubu ile karşılaştırıldığında akut hasar sürecinin 3. gününde en yüksek populasyon değişimi (76 kat) CD140a(+)/Sca1(+) hücre grubunda meydana gelmiştir. CD140a(+)/Sca1(-) hücre populasyonunda oransal değişim meydana gelmemiştir. CD140a(-)/Sca1(+) olan hücre populasyonunda ise 2,3 katlık bir artış olmuştur (Bkz. Şekil 4.2). Tüm populasyon içindeki değişimleri incelendiğinde ise benzer sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.6). Elde edilen bulgular CD140a(+)/Sca1(+) populasyon için hem kontrol grubu hem de akut hasar 3. gün örneklerinde literatür ile uyumludur. Akut hasar sürecinde aktivasyon gösteren CD140a(-)/Sca1(+) populasyon değişimi, tez çalışmasında uygulanan metodolojik yaklaşıma eşlenik bir çalışma gözlenmemiştir. Bu nedenle CD140a(-)/Sca1(+) değişim oranı literatür ile karşılaştırılamamıştır.

Akut hasar sonrası 3. gün FAP'ların en yüksek miktarda gözleendiği populasyon olmakla beraber, bu sürece hasar bölgesine infiltre olan sitotoksik inflamatuvar hücreler de eşlik etmektedir. Sitotoksik hücrelerden salgılanan sitokinler dokuda tamir yollarını aktive ettiği gösterilmiştir. Akut hasarın 3. günü hasar bölgesinde yüksek miktarda ifade olan faktörlerden biri de TNF-alfa'dır(32). Bu faktörün FAP hücre apoptozunu engellediği ve FAP'lar TNF-alfa ile aktive olduğu gösterilmiştir (32). FAP hücre populasyonu TNFa ile aktive olmakla birlikte TNFa bu hücrelerin apoptozunu da engellemektedir. Ancak CD140a(-)/Sca1(+) hücre aktivasyon mekanizmasına yönelik literatürde bilgi bulunmamasıyla birlikte kas lifi dejenerasyonu sonrası ECM'te bulunan proteazların (MMP2, MMP9 vb.) aktivasyonu ile ECM'te bulunan sinyal proteinlerinin proteolitik kesimi ile aktive olduğu gösterilmiştir (Bkz. Tablo 4.3) (57)). Bu faktörlerden en önemlisi de TGF-beta'dır ve ECM'te bulunan proteazların aktivasyonu ile salınmaktadır (58). Bu nedenle, akut hasar sürecinde

CD140a(-)/Sca1(+) stromal hücrelerin aktivasyon mekanizmasını salgılanan TGF-beta üzerinden gerçekleştirebileceği öngörülmüştür. CD140a(+)/Sca1(-) hücre popülasyonunda oransal bir değişim olmamıştır.

Kontrol ve akut hasarın 3. gününde incelenen hücre popülasyonlarının tamamı BrdU katılımı yönünden artış göstermiştir. BrdU analizinde CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-) hücre grubu analiz dışı bırakılmamıştır. Veriler tüm popülasyon içindeki CD140a(+)/Sca1(+) ve CD140a(+)/Sca1(+) hücreleri içermektedir. Elde edilen oransal değişim incelendiğinde inflamatuvar hücrelerde de CD140a(+) ve Sca1(+) olduğu gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.7). İnflamatuvar hücre artışı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında akut hasar örneklerinde CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) popülasyon yüzdesinin 2 kat artmış olduğu gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.2). Uygulanan modelde meydana gelen stromal hücre değişimleri, BrdU katılımı ve inflamasyon oluşumu yönünden literatür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Kronik dejenerasyon modellerinde meydana gelen stromal hücre değişim mekanizmasının karşılaştırılması için uygun bir referans (pozitif kontrol) oluşturduğu gösterilmiştir.

## 5.2 Tenotomi Sürecinde Değişen Stromal Hücre Popülasyonu ve İnflamasyon İlişkisi

Tenotomi, atrofi ve fibrozis mekanizmalarının çalışılması için insanda kullanılmaya (*disuse* atrofi) bağlı gelişen atrofi yollarının taklit edilmesi için uygun bir modeldir. Bu kapsamda farelerde *anterior tibial* tendon kesisini takiben kas lifi atrofi ve fibrozis gelişimi sağlanmıştır (Bkz. Şekil 4.11).

Tenotominin 3. ve 7. günleri gerçekleştirilen profillemeye çalışması sonucunda CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-) popülasyon içinde, CD140a(+)/Sca1(-)/CD140a(+)/Sca1(+) popülasyonların değişmediği, ancak CD140a(-)/Sca1(+) popülasyonun ise dejenerasyonun 3. ve 7. günlerinde yaklaşık kontrole göre 2 katlık artış gösterdiği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.13). Stromal hücrelerin oransal değişimleri tüm popülasyon içinde değerlendirildiğinde benzer oransal değişimler gözlenmiştir. CD140a(-)/Sca1(+) stromal hücre artışının inflamasyon gelişimi ile ilişkisi araştırıldığında, tendon kesisini takiben *preload* (önyük) un azaltılması ile kas dejenerasyonunun tetiklendiği ancak

inflatuar hücre aktivasyonunun meydana gelmediği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.18). Benzer şekilde CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-) populasyon içinde CD140a(+)/Sca1(+) hücre grubunun oransal olarak değişmiyor olması da inflamasyonun tetiklenmediğinin bir göstergesidir. Elde edilen bu veriler BrdU katılımının araştırılması ile de desteklenmiş olup tenotomi sürecinde meydana gelen stromal hücre değişiminin inflamasyondan bağımsız bir mekanizma ile gerçekleştiği doğrulanmıştır (Bkz. Şekil 4.16).

Tenotomi sürecinde gözlenen CD140a(-)/Sca1(+) stromal hücre populasyonunun aktivasyon mekanizması literatür bilgileri ışığında araştırıldığında, inflamatuvar hücre faktörleri ile tetiklenen atrofi mekanizmasının (TNF-alfa aracılı NfKB yolak aktivasyonu), tenotomi sürecinde böyle bir hücresel yanıtın bulunmaması nedeniyle diğer atrofi süreçlerinden farklı bir mekanizma ile düzenlendiği anlaşılmıştır (55, 56, 59). Dolayısıyla gözlenen hücresel aktivasyon mekanizması TNF-alfa ile ilişkili atrofi mekanizması yönünden değerlendirilememektedir. Ancak, fibrozis gelişiminin temel düzenleyicileri yönünden araştırma yapıldığında, TGF- beta temelli bulgulara ulaşılmıştır. TGF-beta akut hasar sürecinde 4. günden itibaren hasar bölgesine infiltre olan M2 makrofajlar tarafından salgılanmaktadır. Ancak inflamatuvar hücre aktivasyonunun olmadığı modellerde ECM'te bulunan MMP2 ve MMP9 gibi matriks metalloproteinazların aktive olduğu gösterilmiştir (60). TGF-beta normal fizyolojide ECM'te LAP (*Latency Associated Factor*) kompleksi halinde ve inaktif formda bulunmaktadır. LAP kompleksi ECM'te bulunan ve aktive olan MMP-2, MMP-9 ve Trombospondin-1 gibi proteazlar tarafından degrade edilerek, TGF-beta aktif formunun salınmasını sağlar. Bu bilgiler ışığında, tenotomi sürecinde CD140a(-)/Sca1(+) hücre populasyon aktivasyonunun, ECM'te proteaz aktivasyonuna bağlı aktif hale geçen TGF-beta tarafından tetiklenmiş olabileceği öngörülmüştür (58).

### **5.3 Denervasyon Sürecinde Değişen Stromal Hücre Populasyonu ve İnflamasyon İlişkisi**

Denervasyon modeli SMA (*Spinal Müsküler Atrofi*) ve ALS (*Amyotrophic lateral sclerosis*)'yi taklit eden model olarak değerlendirilebildiği gibi (klinikte genel kapsamda kullanmama (*disuse* atrofi) sınıfında değerlendirilmekte olup, modelin

linik karşılığı, senil işlev kaybı (sarkopeni)), siyatik sinir yaralanmaları ve omurilik zedelenmeleri sınıfında da bulunmaktadır. Bu model de diğer kronik dejenerasyon modellerinde olduğu gibi kas lifi atrofisi ve fibrozis gözlenmekte olup, diğer dejenerasyon modellerine ek olarak dejenerasyonun geç dönemlerinde yağ infiltrasyonu da gözlenmektedir (61, 62). Tez çalışması kapsamında denervasyonun 10. gününde CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) populasyon içinde stromal hücre populasyon değişimi analiz edilmiş olup, CD140a(+)/Sca1(+) populasyonun 7 kat arttığı, diğer populasyonların ise değişmediği gözlenmiştir. Hücresel değişim oranları tüm hücre populasyonu içinde değerlendirildiğinde, CD45(-)/CD11b(-)/CD31(-) populasyon içindeki oranlara oldukça benzer oranlarda olduğu gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.24, 4.25). Hücresel değişim oranları BrdU pozitifliği yönünden incelendiğinde ise her üç populasyonun kontrole göre BrdU katılımı artış göstermiştir. Ancak hücrelerin oransal ve sayısal değişimleri karşılaştırıldığında, CD140a(+)/Sca1(-), CD140a(-)/Sca1(+) hücrelerin sayısal olarak değişmediği gözlenmiştir. Bu nedenle denervasyon sürecinde aktive olan hücre populasyonunun CD140a(+)/Sca1(+) olduğu gösterilmiştir (Bkz. Şekil: 4.27)

Aktivasyon mekanizması inflamasyon ile yakından ilişkili olan CD140a(+)/Sca1(+) hücre populasyonunun, denervasyon sürecinde hangi mekanizmalar ile dejenerasyon patolojisine katkı sağladığı elde edilen bulgular ve literatür bilgisi ışığında analiz edilmiştir. Öncelikle oluşturulan modelde dejenerasyon patolojisinde inflamatuvar hücre aktivasyonunun meydana gelmediği gösterilmiştir. (Bkz. Şekil 4.28). Ancak, erken dönem denervasyon sürecinde meydana gelen değişiklikler sıralandığında, denervasyondan sonraki 4-7 gün içinde kas lifleri arasında ödem geliştiği (61), spontan fibrilasyonların olduğu (62), kas tonusundaki azalmanın, tetanik kasılmada oluşan gerilim etkisinden daha büyük olduğu, kapiler yatak hacminin arttığı ve post-sinaptik dejenerasyonun meydana geldiği gösterilmiştir (62). Akut hasar sürecinde elde edilen bulgular ve denervasyon sürecinde meydana gelen değişimler ele alındığında, erken denervasyon sürecinde meydana gelen ödem, doku içinde minimal düzeyde de olsa makrofaj aktivasyonunu tetiklemesine bağlı olarak CD140a(+)/Sca1(+) hücre populasyon

aktivasyonuna neden olduğu ön görülmüştür. Denervasyon sürecinde 1-2. haftadan sonra fibrotik değişimlerin gözleniyor olması nedeniyle analizin gerçekleştirildiği 10 günlük süreçte herhangi bir TGF-beta uyarımının meydana gelmemesine bağlı olarak CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunda bir değişikliğin gözlenemediği ön görülmüştür. Literatür ışığındaki bilgiler denervasyonun erken sürecinde makrofaj aktivasyonu (post-sinaptik dejenerasyon) olduğunu göstermektedir (62). Ancak, denerve dokuda literatür bilgisinin sunduğu gibi minimal düzeyde meydana gelen makrofaj aktivasyonu, uygulanan deney sistemi ile gösterilememiştir.

#### **5.4 CD140a(-)/Sca1(+) Hücre Popülasyonunun İzolasyonu ve Karakterizasyonu**

Tez çalışmasında akut hasar sürecinde CD140a(+)/Sca1(+) ve CD140a(-)/Sca1(+) hücrelerde aktivasyon gözlenirken, tenotomi sürecinde CD140a(-)/Sca1(+) hücre aktivasyonu, denervasyon sürecinde ise CD140a(+)/Sca1(+) hücre aktivasyonu ağırlıklı olarak gözlenmiştir. Literatürde FAP olarak isimlendirilen hücre grubunun CD140a ve Sca1 pozitif olmasına yönelik farklı görüşler bulunmaktadır. Sadece CD140a pozitifliği üzerinden analiz yapan araştırmacılar bulunduğu gibi (27), sadece Sca1 pozitifliğini ve çift pozitifliğini ele alan araştırmacılar da bulunmaktadır (26). Ancak tez çalışması kapsamında, farklı dejenerasyon süreçlerinde farklı stromal popülasyonların aktive olduğu ortaya konmuştur. Hücreler arasındaki aktivasyon mekanizmalarının farklılık gösteriyor olmasının bu hücrelerin farklı fenotiplerde hücre grupları olduğu sonucunu göstermiştir. Bu duruma ek olarak Sca1 belirteci genel bir kök hücre belirtecidir. CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunun homojen olmayan bir kök hücre havuzuna ait bir fenotipik belirteç olması mümkündür. Bu kapsamda, iskelet kas dokusunda bulunan CD140a(-)/Sca1(+) hücre özellikleri araştırıldığında, Sca1 pozitif hücrelerin kasta endomizial yerleşimli olduğu, myojenik farklılaşma göstermediği ve satellit hücrelerin Sca1 belirteci yönünden negatif olduğu belirlenmiştir (63). Tez çalışması kapsamında analiz edilen CD140a(-)/Sca1(+) hücreler adipojenik ve miyojenik farklılaşma kapasiteleri yönünden incelendiğinde hücrelerin adipojenik farklılaşmaya gittiği, miyojenik farklılaşma ortamında spontan adipojenik farklılaşma gösterdiği gözlenmiştir (Bkz. Şekil: 4.31). Elde edilen bulgular, CD140a(-)

)/Sca1(+) hücrelerin miyojenik farklılaşma özelliği olmayan stromal hücreler olduğunu kanıtlamıştır.

### **5.5 CD140a(-)/Sca1(+) Hücre Populasyonunun Aktivasyon Mekanizmasının İncelenmesi**

İzole edilen CD140a(-)/Sca1(+) hücre grubunun fibrozis gelişimi ya da yeniden doku modellemesine katkı sağlayıp sağlamadığının araştırılması amacı ile kontrol kas grubu ve dejenerasyonun 3. günü kas örneklerinden CD140a(-)/Sca1(+) hücre grubu izole edilerek vakit geçirmeden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşımın benimsenmesinin temel nedeni CD140a(-)/Sca1(+) hücrelerin aktivasyon durumundaki gen ifade değişimlerinin incelenmesidir. Gerçekleştirilen yüksek ölçekli RNA dizileme çalışması kapsamında kontrole göre artan ve azalan genler listelenmiş olup, “*DAVID Annotation Tool*” kullanılarak küme ve yolak analizi gerçekleştirilmiştir. İfade artışı gösteren genlerin büyük bir çoğunluğunun ECM ve reseptör ilişkisine ait olduğu, diğer ifade artışı gösteren genler incelendiğinde ise hücre proliferasyonu ve migrasyonundan sorumlu sinyal yolağı olan PI3K-Akt ve TGF-beta sinyal yolağına ait olduğu gözlenmiştir. Bu yönü ile dejenerasyon sürecinde aktive olan CD140a(-)/Sca1(+) hücre grubunun fibrozis ve dokunun yeniden modellenmesine yönelik bağ dokusu bileşenlerini yüksek miktarda ifade ettiği, PI3K-Akt sinyal yolağı aracılığı ile aktive olduğu ve TGF-beta sinyal mekanizması üzerinden gen ifadesinin düzenlendiğine yönelik sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. Şekil:4.32-34, Tablo 4.1-4.4). Aktive olan CD140a(-)/Sca1(+) hücrelerde adezyon moleküllerinin ifade azalışı göstermesi, bu hücrelerin rejenerasyon sürecinde migrasyon eğiliminde olduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil: 4.35).

Aktive olan CD140a(-)/Sca1(+) hücre grubuna ait ifade artışı gösteren gen listesi, daha önce araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirilen tenotomi *microarray* çalışması ile karşılaştırılmıştır ve 88 adet ortak gen listesinin bulunduğu gözlenmiştir. Bu genlerin fonksiyon ve hangi yolakta görev aldığına yönelik analiz gerçekleştirildiğinde, büyük bir çoğunluğunun ECM bileşeni olduğu gözlenmiştir. Bu

bulgular CD140a(-)/Sca1(+) hücrelerin tenotomi sürecinde dokunun yeniden modellenmesi ve/veya fibrozis gelişimine katıldığını kanıtlamaktadır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

### 6.1 SONUÇLAR

- Akut hasar sonrası 3.günde en çok artış gösteren hücre popülasyonunun CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-)/CD140a(+)/Sca1(+) hücre popülasyonu olduğu, sadece CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-)/CD140a(-)/Sca1(+) popülasyonunda ise daha sınırlı bir aktivasyonun meydana geldiği gösterilmiştir.
- Tendon kesisini takip eden 7 günlük süreçte meydana gelen stromal hücre değişimleri incelendiğinde sadece CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-)/CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunda üç katlık bir artış olduğu, diğer popülasyonların değişmediği gösterilmiştir.
- Siyatik sinir kesisini takip eden 10 günlük süreçte meydana gelen stromal hücre değişimleri incelendiğinde sadece CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-)/CD140a(+)/Sca1(+) hücre popülasyonunun kontrole göre 7 katlık artış gösterdiği gözlenmiştir.
- Tenotomi ve denervasyon modellerinde meydana gelen stromal değişimlerin inflamasyondan bağımsız olarak meydana geldiği gösterilmiştir.
- İzole edilen CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-)/CD140a(-)/Sca1(+) hücreler adipojenik ve miyojenik farklılaşma ortamlarında adipojenik farklılaşma gösterdikleri, miyojenik farklılaşma kapasitelerinin bulunmadığı gösterilmiştir.
- **Üç farklı modelde stromada bulunan farklı hücre popülasyonlarının aktive olması, bu hücrelerin birbirinden farklı olduklarını ve farklı moleküler düzenlemeler ile kontrol edildiklerini göstermiştir.**
- Denervasyon modeli dışında (1.6 kat), akut hasar ve tenotomi modelinde CD31(-)/CD45(-)/CD11b(-)/Sca1(-)/CD140a(+) hücre popülasyonunda oransal olarak herhangi bir değişim meydana gelmemiştir. Bu hücre grubunun CD140a(+)/Sca1(-)ve CD140a(-)/Sca1(+) hücre grubundan bağımsız ve farklı fizyolojik özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir.
- CD140a(-)/Sca1(+) hücre popülasyonunun ECM yeniden yapılanmasına katkı sağladığı, tenotomi sürecinde fibrozis gelişiminde etkili olduğu ve TGF-beta sinyal yolağının hücrelerin aktivasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir.



## 6.2 ÖNERİLER

- Tez çalışması ile elde edilen sonuçların devamında CD140(+)/Sca1(+) (FAP hücreleri) hücrelerin izolasyonuna yönelik metodolojik yaklaşımların optimize edilerek yüksek ölçekli transkriptom çalışmaları ile bu hücrelerin aktivasyon mekanizmalarının detaylandırılması planlanmaktadır.
- CD140a(-)/Sca1(+) hücreler ile CD140a(+)/Sca1(+) hücrelerin yüksek ölçekli transkriptom verilerinin karşılaştırılması ile fibrozis sürecine etki eden yolların açıklanması planlanmaktadır.
- Farklı dejenerasyon süreçlerine eşlik eden farklı stromal populasyonların fibrozis gelişiminde rol alan yolların belirlenmesi ile anti-fibrotik tedavi aday moleküllerinin belirlenmesi planlanmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Basmajian JV. Control and training of individual motor units. *Science*. 1963;141(3579):440-1.
2. Gartner LP, Hiatt, J.L. *Color textbook of histology 3rd bs. ed*: Philadelphia,PA: Saunders/Elsevier; 2007.
3. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/10-2-skeletal-muscle/>. [
4. <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/muscular/structure.html>. [
5. Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughan DM. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol*. 1994;266(6 Pt 1):C1485-504.
6. Hall JE, Guyton, A.C. . *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 12th bs ed: Philadelphia, Pa.: Saunders/Elsevier; 2011.
7. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961;9:493-5.
8. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84(1):209-38.
9. Tidball JG. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol*. 2011;1(4):2029-62.
10. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(5):R1173-87.
11. Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J Cell Biol*. 2001;155(1):123-31.
12. Kinali M, Mercuri E, Main M, Muntoni F, Dubowitz V. An effective, low-dosage, intermittent schedule of prednisolone in the long-term treatment of early cases of Duchenne dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2002;12 Suppl 1:S169-74.
13. Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2009;18(3):482-96.
14. Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol*. 2001;98(2):235-43.
15. Gussoni E, Pavlath GK, Miller RG, Panzara MA, Powell M, Blau HM, et al. Specific T cell receptor gene rearrangements at the site of muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Immunol*. 1994;153(10):4798-805.
16. Anderson JE. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell*. 2000;11(5):1859-74.

17. Almeida CF, Fernandes SA, Ribeiro Junior AF, Keith Okamoto O, Vainzof M. Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1078686.
18. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* (1985). 2001;91(2):534-51.
19. Klimczak A, Kozłowska U. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. *Stem Cells Int.* 2016;2016:4285215.
20. Mitchell KJ, Pannerec A, Cadot B, Parlakian A, Besson V, Gomes ER, et al. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat Cell Biol.* 2010;12(3):257-66.
21. Goyal N, Narayanaswami P. Making Sense of Antisense Oligonucleotides: A Narrative Review. *Muscle Nerve.* 2017.
22. Skuk D, Tremblay JP. Cell therapy in muscular dystrophies: many promises in mice and dogs, few facts in patients. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(9):1307-19.
23. Konieczny P, Swiderski K, Chamberlain JS. Gene and cell-mediated therapies for muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 2013;47(5):649-63.
24. Peault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, et al. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther.* 2007;15(5):867-77.
25. Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development.* 2011;138(17):3625-37.
26. Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol.* 2010;12(2):153-63.
27. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 2010;12(2):143-52.
28. Holmes C, Stanford WL. Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *Stem Cells.* 2007;25(6):1339-47.
29. Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, et al. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 21):3654-64.
30. Wosczyzna MN, Biswas AA, Cogswell CA, Goldhamer DJ. Multipotent progenitors resident in the skeletal muscle interstitium exhibit robust BMP-dependent osteogenic activity and mediate heterotopic ossification. *J Bone Miner Res.* 2012;27(5):1004-17.

31. Natarajan A, Lemos DR, Rossi FM. Fibro/adipogenic progenitors: a double-edged sword in skeletal muscle regeneration. *Cell Cycle*. 2010;9(11):2045-6.
32. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang CK, Lee ST, Fiore D, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med*. 2015;21(7):786-94.
33. Ito T, Ogawa R, Uezumi A, Ohtani T, Watanabe Y, Tsujikawa K, et al. Imatinib attenuates severe mouse dystrophy and inhibits proliferation and fibrosis-marker expression in muscle mesenchymal progenitors. *Neuromuscul Disord*. 2013;23(4):349-56.
34. Mueller AA, van Velthoven CT, Fukumoto KD, Cheung TH, Rando TA. Intronic polyadenylation of PDGFRalpha in resident stem cells attenuates muscle fibrosis. *Nature*. 2016;540(7632):276-9.
35. Eisenberg BR. . Bethesda M. Quantitative ultrastructure of mammalian skeletal muscle. In: *Handbook of Physiology. Skeletal Muscle*. AmPhysiol Soc. 1983(sect. 10):p. 73–112.
36. <https://knowledgeforall1415.wordpress.com/about/> [
37. Ohlendieck K, Ervasti JM, Snook JB, Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex is highly enriched in isolated skeletal muscle sarcolemma. *J Cell Biol*. 1991;112(1):135-48.
38. Schiaffino S, Sandri M, Murgia M. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:269-78.
39. Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, et al. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol*. 2004;164(3):1007-19.
40. MacDonald EM, Cohn RD. TGFbeta signaling: its role in fibrosis formation and myopathies. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(6):628-34.
41. Chan YS, Li Y, Foster W, Fu FH, Huard J. The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. *Am J Sports Med*. 2005;33(1):43-51.
42. Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, et al. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve*. 2003;28(3):365-72.
43. Aronson JK. *Meyler's Side Effects of Cardiovascular Drugs*. 1st Edition ed: Elsevier Science; 2009.
44. Collins CA, Morgan JE. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol*. 2003;84(4):165-72.

45. Kornegay JN. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle*. 2017;7(1):9.
46. Abrams RA, Tsai AM, Watson B, Jamali A, Lieber RL. Skeletal muscle recovery after tenotomy and 7-day delayed muscle length restoration. *Muscle Nerve*. 2000;23(5):707-14.
47. Laurin J, Gondin J, Dousset E, Decherchi P. Effect of tenotomy on metabosensitive afferent fibers from tibialis anterior muscle. *Exp Brain Res*. 2008;186(1):87-92.
48. Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, et al. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve*. 1997;20(7):858-66.
49. Akpulat U, Onbasilar I, Kocafe YC. Tenotomy immobilization as a model to investigate skeletal muscle fibrosis (with emphasis on Secreted frizzled-related protein 2). *Physiol Genomics*. 2016;48(6):397-408.
50. Mendell JR, Kissel JT, Amato AA, King W, Signore L, Prior TW, et al. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*. 1995;333(13):832-8.
51. Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*. 2006;444(7119):574-9.
52. Blat Y, Blat S. Drug Discovery of Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Biomol Screen*. 2015;20(10):1189-203.
53. Judson RN, Zhang RH, Rossi FM. Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs? *FEBS J*. 2013;280(17):4100-8.
54. Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Front Physiol*. 2014;5:68.
55. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):C834-43.
56. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses*. 2007;69(2):310-21.
57. Carmeli E, Haimovitch TG, Nemcovsky CE. Expression of matrix metalloproteinase 2 and heat shock protein-72 in immobilized muscle in rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006;6(1):96-102.
58. Mendias CL, Gumucio JP, Davis ME, Bromley CW, Davis CS, Brooks SV. Transforming growth factor-beta induces skeletal muscle atrophy and fibrosis through the induction of atrogen-1 and scleraxis. *Muscle Nerve*. 2012;45(1):55-9.

59. Hunter RB, Stevenson E, Koncarevic A, Mitchell-Felton H, Essig DA, Kandarian SC. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J.* 2002;16(6):529-38.
60. Zhang Q, Joshi SK, Manzano G, Lovett DH, Kim HT, Liu X. Original article Muscle extracellular matrix degradation and contractibility following tendon rupture and disuse. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2013;3(1):35-41.
61. May DA, Disler DG, Jones EA, Balkissoon AA, Manaster BJ. Abnormal signal intensity in skeletal muscle at MR imaging: patterns, pearls, and pitfalls. *Radiographics.* 2000;20 Spec No:S295-315.
62. Carlson BM. The Biology of Long-Term Denervated Skeletal Muscle. *Eur J Transl Myol.* 2014;24(1):3293.
63. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 2002;159(1):123-34.

## 8. EKLER

### EK1: Yüksek Ölçekli RNA Dizi Analizi Kalite Kontrol Parametreleri

	Kontrol-Sca1	Akut -Sca1
N_unmapped	5522486	6373620
N_multimapping	4377442	5190583
N_noFeature	5557505	5465104
N_ambiguous	1107583	1261784
<b>MAPPED_READS</b>	17544088	21244479
<b>MAX #READS</b>	617159	269808
<b>25th PERCENTILE of NON-ZERO READS</b>	17	19
<b>Annotated Reads</b>	24119	24119
<b>UPREGULATED &gt;2</b>	796	
<b>DOWNREGULATED &gt;2</b>	481	

### Star QC data

	Kontrol-Sca1(+)	Akut-Sca1(+)
Started job on	Nov 22 09:57:50	Oct 30 14:14:27
Started mapping on	Nov 22 09:58:37	Oct 30 14:15:15
Finished on	Nov 22 10:02:26	Oct 30 14:19:37
<b>Mapping speed</b>		
Million of reads per hour	536.21	543.24
Number of input reads	34109104	39535570
Average input read length	110	104
<b>UNIQUE READS:</b>		
Uniquely mapped reads number	24180494	27931610
Uniquely mapped reads %	70.89%	70.65%
Average mapped length	109.94	103.41
Number of splices: Total	1827344	1996656
Number of splices: Annotated (sjdb)	1464801	1584248
Number of splices: GT/AG	1553020	1690223
Number of splices: GC/AG	15334	16533
Number of splices: AT/AC	1617	1955
Number of splices: Non-canonical	257373	287945
Mismatch rate per base	1.24%	1.23%
Deletion rate per base	0.28%	0.28%

Deletion average length	1.17	1.16
Insertion rate per base	0.37%	0.36%
Insertion average length	1.15	1.15
<b>MULTI-MAPPING READS:</b>		
Number of reads mapped to multiple loci	4552570	5375061
% of reads mapped to multiple loci	13.35%	13.60%
Number of reads mapped to too many loci	1325585	1278120
% of reads mapped to too many loci	3.89%	3.23%
<b>UNMAPPED READS:</b>		
% of reads unmapped: too many mismatches	0.00%	0.00%
% of reads unmapped: too short	10.72%	10.86%
% of reads unmapped: other	1.16%	1.67%
<b>CHIMERIC READS:</b>		
Number of chimeric reads	0	0
% of chimeric reads	0.00%	0.00%



## EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 - Faks: 0 (312) 310 0580  
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index\_hdk.php

Sayı: 52338575 - 132


27.11.2014

### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 18.11.2014 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2014/9
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2014/57
KARAR NUMARASI	: 2014/57-04
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Doç. Dr. Yusuf Çetin KOCAEFE
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Doç. Dr. Yusuf Çetin KOCAEFE, Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR ve Uzm. Bio Cansu Özdemir SAKA - 60 adet S-D sıçan

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Yusuf Çetin KOCAEFE'nin araştırma yürütücüsü olduğu 2014/57 kayıt numaralı "*Erken İskelet Kas Dejenerasyon Sürecinde Dejenerasyon Patolojisini Oluşturan Kas Dışı Hücresel Komponentin İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

  
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı



Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/26

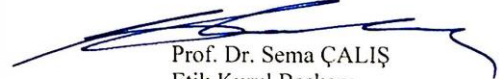
24 Ocak 2015

**Prof.Dr.Yusuf Çetin KOCAEFE**  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi

**Sayın Prof.Dr. KOCAEFE,**

Sorumlu araştırmacısı olduğunuz Kurulumuzun 18.11.2014 tarihli toplantısında onaylanan, 2014/57 dosya kayıt numaralı ve *“Erken İskelet Kas Dejenerasyon Sürecinde Dejenerasyon Patolojisini Oluşturan Kas Dışı Hücresel Komponentin İncelenmesi”* başlıklı çalışmanıza ilişkin proje önerisinde yer verilen deneysel prosedür, işlemler ve tüm girişimler aynı kalmak koşulu ile çalışmanın “fare” (swiss – white) türü üzerinde gerçekleştirilmesi talebiniz Kurulumuzun 03.02.2015 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

  
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı



# HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Hacettepe 06100, ANKARA

22 Haziran 2009

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/ 45

## HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 18.06.2009 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2009/7
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2009/30
KARAR NUMARASI	: 2009/30-4
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Çetin Kocaefe
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Doç. Dr. Çetin Kocaefe
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Cansu Özdemir, Uğur Akpulat
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 48 adet S-D sıçan
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ	: 12 ay

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Çetin Kocaefe'nin yürütücüsü olduğu 2009/30 dosya numaralı ve "*Deneyel Akut Kas Hasarı Modeli Süreci Oluşturulması ve Süreçte Çözünebilir Proteinlerin İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Hakan S. ORER  
Etik Kurul Başkanı

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### CANSU ÖZDEMİR SAKA

<b>Doğum Tarihi</b>	06.10.1986
<b>Kurum</b>	Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Bilimleri
<b>Pozisyon</b>	Doktora sonrası araştırmacı
<b>Telefon :</b>	0555 419 93 30
<b>e-posta :</b>	cansuozdemir@hacettepe.edu.tr

### EĞİTİM BİLGİLERİ

Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Hacettepe Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	KÖK HÜCRE	Doktora	2012-2017
Hacettepe Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	TIBBİ BİYOLOJİ	Yüksek Lisans	2010
Hacettepe Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	BİYOLOJİ	Lisans	2008

### AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Thinklab Teknolojik Hizmetler Tic.Ltd.Şti	Proje Koordinatörü	Şirket Müdürü	2016-Halen
Hemosoft Bilişim ve Eğitim Hiz. Ltd. Şti.	Arge	Arge Personeli	2014-2016
IDC Savunma Sanayi Nakliye TİC. A.Ş	Arge	Arge Personeli	2011-2015

## UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
<ul style="list-style-type: none"><li>• İskelet kası dejenerasyonu ve dejenerasyon patolojisi etkeni kök hücrelerin biyolojisi</li><li>• İskelet kası gelişimi moleküler regülasyonu</li><li>• Fibrozisin hücrel ve moleküler regülasyonu</li><li>• Moleküler hücre biyolojisi</li><li>• Kök hücre biyolojisi</li><li>• Kök hücre kitleri</li><li>• Antikor ve aptamer tabanlı biosensör sistemleri</li></ul>

## PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Tarih	Görev	Proje Türü
Yeni Nesil Kök Hücre Farklılaştırma Kitlerinin Yerli Üretimi	TÜBİTAK 1512	01.07.2016 - 30.06.2017	Proje Yürütücüsü	Ulusal
İskelet Kas Dokusunda Stromal Hücre Populasyonunun Karakterize Edilmesi	TÜBİTAK 1002	01.08.2015 - 01.08.2016	Bursiyer	Ulusal
UPKH (Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre) Banka Teknolojileri Geliştirme	TÜBİTAK 1003	2014-2017	UPKH karakterizasyonu	Ulusal
Akut Lösemi Ön Tanısı İçin Bir Kit ve Hasta Baş Test Cihazı Geliştirilmesi	TÜBİTAK 1511	01.10.2014 - 30.09.2016	Arge Personeli	Sanayi/Özel Sektör
Üç Boyutlu Esnek Akışkanların Geliştirilmesi	TÜBİTAK TEYDEB	01.01.2014 - 30.06.2016	Arge Personeli	Uluslararası
İçme Sularında Zararlı Mikroorganizmaların Saptanması İçin Taşınabilir ve Hızlı Tanımlama Sisteminin Geliştirilmesi	TÜBİTAK TEYDEB	01.08.2011 - 30.06.2012	Arge Personeli	Sanayi/Özel Sektör

Biyosensörler	Milli Savunma Bakanlığı ArGe Daire Başkanlığı	2009-2014	Arge Personeli	Kamu
Genetik Kökenli Enzim Eksiklerine Yönelik Enzim Replasmanı Sağlamak Amacıyla Yağ Hücrelerinin Yeniden Programlanması ve Tedavide Kullanılabilme Potansiyelinin Araştırılması	TÜBİTAK SBAG	01.07.2007 - 01.07.2010	Bursiyer	Ulusal

## YAYINLARI

### SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

**Ozdemir, Cansu;** Akpulat, Ugur; Sharafi, Parisa; Yildiz, Yilmaz; Onbasilar, Ilyas; Kocaeffe, Cetin, Periostin is temporally expressed as an extracellular matrix component in skeletal muscle regeneration and differentiation, 2014, GENE

### Uluslararası Kongrelerde Sunulan Uluslararası Hakemli Dergilerin Özel Sayılarında Yayınlanmış Bildiriler

**Özdemir C.**, Akçay D., Kocaeffe Ç. Characterization of the stromal cell population that interplay in skeletal muscle degeneration. Muscle Res Cell Motil (2017)

**Ozdemir C.**, Akpulat U., Onbasilar O., Kocaeffe C., AEBP1/ACLP is Upregulated in Differentiation, Injury Repair and Fibrotic Degeneration of Skeletal Muscle. Muscle Res Cell Motil (2014)

Akpulat U, Yildiz Y, **Ozdemir C**, Sharafi P, Onbasilar I, Kocaeffe C. Klf5 modulates proliferation and differentiation of myoblasts. Muscle Res Cell Motil (2014) 35:65–142 DOI 10.1007/s10974-014-9384-y

### Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

**Özdemir C.**, Akçay D., Kocaeffe Ç. Characterization of the stromal cell population that interplay in skeletal muscle degeneration. Muscle Res Cell Motil (19-22 September 2017). 45<sup>th</sup> European Muscle Society Almanya (Poster)

**Ozdemir C.**, Akpulat U., Onbasilar O., Kocaeffe C., AEBP1/ACLP is Upregulated in Differentiation, Injury Repair and Fibrotic Degeneration of Skeletal Muscle. Muscle

Res Cell Motil (21-25 September 2015). 44<sup>th</sup> European Muscle Society Polonya (Poster)

Akpulat U., Yildiz Y., Sharafi P, **Ozdemir C**, Onbasilar I, Kocaeffe C. A Novel Role for Krüppel-Like Factor 5 (KLF5) in the Differentiation and Regeneration of Skeletal Muscle.  
EMBO Workshop, Molecular Biology of Muscle Development and Regeneration, May 14 – 18, 2014 Acaya, Lecce, Italy (Poster)

Akpulat U., Yildiz Y., Sharafi P, **Ozdemir C**, Onbasilar I, Kocaeffe C. A Novel Role for Krüppel-Like Factor 5 (KLF5) in the Differentiation and Regeneration of Skeletal Muscle. 2nd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. 22-23 November 2013 Istanbul (Sözlü sunum)

Akpulat U, Yildiz Y, **Ozdemir C**, Sharafi P, Onbasilar I, Kocaeffe C. Klf5 modulates proliferation and differentiation of myoblasts. 42nd European Muscle Conference, 21-25 September 2013, Amsterdam, Netherlands (Poster).

Akpulat U, Yildiz Y, **Ozdemir C**, Sharafi P, Onbasilar I, Kocaeffe C. A novel role for a ubiquitous zinc finger Klf5 is a modulator of skeletal muscle differentiation and regeneration regulated by sumoylation. The 4th EMBO Meeting, Nice-France, 22-25 September 2012 (Poster)

**Ozdemir C**, Akpulat U, Onbasilar I, Kocaeffe C. Periostin is an extracellular matrix component expressed in the course of myogenic differentiation and regenerating muscle tissue. The 4th EMBO Meeting, Nice-France, 22-25 September 2012 (Poster)

Yildiz Y, Akpulat U, **Özdemir C**, Sharafi P, Onbasilar I, Uren D, Kocaeffe C. Klf5 is an emerging transcription factor with a role in skeletal muscle regeneration and differentiation.  
EMBO Molecular Medicine Conference, Molecular Insights for Innovative Therapies, EMBL Advanced Training Centre Heidelberg, Germany, 01 – 03 December 2011 (Sözlü Sunum)

Sharafi P, Akpulat U, **Özdemir C**, Cirak T, Onbasilar I, Kocaeffe C. Adipocytes as Novel Cell Therapy Targets for Inherited Enzyme Deficiencies. EMBO Molecular Medicine Conference, Molecular Insights for Innovative Therapies, EMBL Advanced Training Centre Heidelberg, Germany, 01 – 03 December 2011 (Poster)

Sharafi P, Akpulat U, **Özdemir C**, Cirak T, Onbasilar I, Denktas E, Kocaeffe C. Targetting

Adipocytes as a Novel Cell Therapy Approach for Inherited Enzyme Deficiencies. International Conference on Enzyme Science and Technology ,31 October 04 November, 2011,Kusadası- Turkey (Poster)

Akpulat U, **Özdemir C**, Onbasilar I, Kocaeefe C. Endomysial fibrosis in tenotomy immobilized muscle is coupled with SFRP2 expression from slow-twitch fibers. The EMBO meeting, 29 August-1 September 2009, Amsterdam, Netherlands (Poster)

### **Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler**

Akpulat U, Yıldız Y, Sharafi P, **Özdemir C**, Onbaşilar İ, Kocaeefe Ç. Krüppel-like faktör 5 rejenerasyon sürecinde myoblastların proliferasyonu ve farklılaşması için gereklidir. 13'üncü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2013, Kuşadası – Aydın (Sözlü sunum)

### **Bilimsel Aktiviteler:**

- Nöromüsküler Hastalıklar Kongresi (Poster bildirisi ile katılım), Aralık 2017
- 44. Avrupa Kas Kongresi, Polonya (Poster bildirisi ile katılım), Eylül 2015
- 4. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi. Kapadokya, Mart 2014
- Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre Günü. Ankara, Kasım 2013
- Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Derneği, Rejeneratif Tıp Sempozyumu. Çanakkale Mart 2013
- The European Molecular Biology Organisation (EMBO) Meeting (Poster bildirisi ile katılım) Fransa, Eylül 2012
- Hacettepe Üniversitesi HÜKOK, 1.Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Günü. Ankara, Mayıs 2012
- 11. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Bodrum, Ekim 2009
- The European Molecular Biology Organisation (EMBO) Meeting (Poster bildirisi ile katılım) Amsterdam, Ağustos-Eylül 2009
- TÜBA 4. Kök Hücre Sempozyumu Ankara, Haziran 2009
- Hacettepe Üniversitesi, Histoloji Embriyoloji A.D, Doku Mühendisliği Uygulamalarında: Biyomalzeme- Doku Uyumu, Ankara, Mart 2009
- 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Ankara, Haziran 2008



- Hacettepe Üniversitesi, Onkoloji Ens. , MikroRNA'lar ve Meme Kanserindeki rolleri. Haziran 2008
- Bilkent Üniversitesi ' Horizons in Molecular Biology and Genetics', Mayıs 2008
- Bilkent Üniversitesi, Molecular Basis of Human Cancer Therapy, Mart 2008 5. İnsan Kaynakları ve Kişisel Gelişim Kongresi Ankara, Mart 2007
- Ege Üniversitesi Ulusal Nörobiyoloji Yaz Okulu, İzmir, Ağustos 2007
- 6. Ankara Biyoteknoloji Günleri Ankara, Kasım 2007

#### **SERTİFİKALAR**

- TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Monoklonal Antikor Üretim sertifikası
- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası